NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

220. BAND

MIT 196 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1953

Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.
Printed in Germany.

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.

Inhalt des 220. Bandes.

Seite

Basold, A., und **H. F. Zipf,** Elektromyographische Wertbestimmung von neuromuskulär lähmenden Stoffen am Tier. Mit 4 Textabbildungen . . . 255

Baß, H., s. **Fleckenstein, A.**

Benson, W. M., s. **Randall, L. O., J. Kruger, C. Conroy** and **B. Kappell.**

Bohn, H., s. **Koch, E., F. Heiß** und **R. Schneider.**

Bönicke, R., und **W. Reif,** Enzymatische Inaktivierung von Isonicotinsäurehydrazid im menschlichen und tierischen Organismus. Mit 5 Textabbildungen 321

Bovet-Nitti, F., und **D. Bovet,** Bis-(2-Diäthylaminoäthyl)-benzoldicarbonsäureester-dialkyljodide als spezifische Hemmstoffe der True-Cholinesterase und der Pseudo-Cholinesterase. Mit 4 Textabbildungen. 52

Bovet, D., s. **Bovet-Nitti, F.**

Brett, R., und **H. Theismann,** Medikamentöse Beeinflussung verschieden bedingter Erytheme. Mit 5 Textabbildungen. 295

— —, Zur Messung der Blutfülle in der lebenden menschlichen Haut. Mit 3 Textabbildungen. 437

Busse, W., und **S. J. Loennecken,** Pharmakologische Beeinflußbarkeit reflektorisch-toxischer Digitaliswirkungen (Bradykardie und Erbrechen) über die Herznerven 232

Cheymol, J., s. **Hazard, R.,** et **E. Corteggiani.**

Conroy, C., s. **Randall, L. O., J. Kruger, B. Kappell** and **W. M. Benson.**

Corteggiani, E., s. **Hazard, R.,** et **J. Cheymol.**

Culp, W., s. **Taugner, R.**

Dallemagne, M. J., s. **Philippot, E.**

Damann, R., s. **Pichotka, J.,** und **B. von Kügelgen.**

Davis, B. D., and **U. Weiss,** Aromatic Biosynthesis. VIII. The Roles of 5-Dehydroquinic Acid and Quinic Acid. 1

Deckert, R., s. **Enders, A.**

Dörner, J., Fehlermöglichkeiten bei der Durchblutungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach H. Rein. Mit 6 Textabbildungen 490

Dybing, O., Die Toxizität und Herzwirkung des Scillirosids 207

Enders, A., und **R. Deckert,** Die Elimination von Trithionderivaten in der Galle. Mit 2 Textabbildungen 418

Engelhardt, A., und **K. Greeff,** Die Wirkung der Piqûre auf den Hormongehalt und die hormonale Zusammensetzung des Nebennierenmarks. Mit 4 Textabbildungen. 211

Erdmann, W.-D., und **H. F. Henne,** Über die Wirkung ganglienblockierender Stoffe auf die Gallenentleerung unter besonderer Berücksichtigung von Magnesiumsulfat. Mit 4 Textabbildungen 184

Flacke, W., G. Mülke und **R. Schulz,** Beitrag zur Wirkung von Pharmaka auf die Unterdrucktoleranz. Mit 10 Textabbildungen 469

Seite

Fleckenstein, A., und **H. Baß,** Zum Mechanismus der Wirkungsverstärkung und Wirkungsabschwächung sympathomimetischer Amine durch Cocain und andere Pharmaka. I. Mitteilung: Die Sensibilisierung der Katzen-Nickhaut für Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe. Mit 5 Textabbildungen 143

Frimmer, M., Weitere Untersuchungen über die retikuloendotheliale Clearance für Makromoleküle. V. Mitteilung. Der Einfluß von Stickstofflost, Äthylurethan und Triäthylenmelamin auf die RES-Funktion. Mit 3 Textabbildungen 334

—, Weitere Untersuchungen über die retikulo-endotheliale Clearance für Makromoleküle. VI. Mitteilung. Über den Einfluß der Schilddrüsenfunktion. Mit 4 Textabbildungen. 443

Gerbstädt, H., und **G. Kotulek,** Die osmotische Resistenzkurve der vitalgranulierten Erythrocyten. Mit 2 Textabbildungen 264

Gerlich, N., und **R. Remy,** Antiperniciös wirksame Stoffe bei der Bleianämie. Mit 2 Textabbildungen 351

Greeff, K., s. **Engelhardt, A.**

Grundfest, H., Anomalous action of high concentration of microinjected acetylcholine on the spike of the giant axon of squid. With 4 figures in the text 136

Harwart, A., s. **Langecker, H.,** und **K. Junkmann.**

Hanna, C., and **J. H. Shutt,** Papaverine Analogs. VI Relationship Between Chemical Structure and Coronary Vasodilator Action. With 4 figures in the text 43

Hazard, R., J. Cheymol et **E. Corteggiani,** Effets anticholinesterasiques et action sensibilisante sur l'acétylcholine de quelques curares de synthèse. Avec 3 figures. 62

Heiß, F., s. **Koch, E., H. Bohn** und **R. Schneider.**

Henne, H. F., s. **Erdmann, W.-D.**

Hertzsch, W., s. **Heubner, W.**

Heubner, W., und **W. Hertzsch,** Über Bromderivate des Pentaerythrits . . . 251

—, und **D. Vießmann,** Reflektorische Atemhemmung durch p-Chlor-phenyläthanolamin. Mit 3 Textabbildungen 40

Hildebrandt, F., und **E. Paas,** Pharmakologische Untersuchungen über das Glykosidgemisch aus Boviea volubilis. Mit 1 Textabbildung 482

—, und **W. Reinartz,** Zur Kumulation der Reinglykoside Digoxin, Digitoxin und Boviea. (Nach Versuchen mit der Brechdosis an der Taube.) Mit 1 Textabbildung 290

Hoffmann, G., Vorrichtung zum mechanischen Druckausgleich am isoliert durchströmten Herzen nach LANGENDORFF. Mit 1 Textabbildung 193

Hollinck, H. L., s. **Pick, E. P.,** und **G. Zacharellis.**

Jung, F., s. **Stahl, K. E.**

Junkmann, K., Über protrahiert wirksame Östrogene. Mit 1 Textabbildung . 358

—, s. **Langecker, H.,** und **A. Harwart.**

Kaller, H., und **W. Koll,** Der Einfluß von zugeführter Glucuronsäure auf die Dauer der Avertin-Narkose 225

Kappell, B., s. **Randall, L. O., J. Kruger, C. Conroy** and **W. M. Benson.**

Kaunitz, H., Studien über die Ernährung von Ratten mit hochoxydierten Fetten. Mit 3 Textabbildungen 16

Klingmüller, V., und **W. Schroeder,** Immunologische und polarimetrische Untersuchungen von Eiweißkörpern und Netzmitteln. 2. Mitteilung. . . 245

Koch, E., H. Bohn, F. Heiß und **R. Schneider,** Über Penicillinintoxikation. Ihre cerebral ausgelösten klinischen Standardsyndrome. Penicillinase-

Seite

aktivität des Gehirns und weitere Schutzmechanismen. Mit 3 Textabbildungen 157

Kolder, H., Hexachlorcyclohexan-Wirkung auf das Elektroretinogramm des Frosches. Mit 2 Textabbildungen 433

Koll, W., s. **Kaller, H.**

Kotulek, G., s. **Gerbstädt, H.**

Kramer, M., Entzündungshemmung durch Eisenpräparate. Mit 2 Textabbildungen 391

Krieg, A., Plastischer Tonus der Magenring-Muskulatur und Theophyllin-Effekt. Mit 2 Textabbildungen 317

Kruger, J., s. **Randall, L. O., C. Conroy, B. Kappell** and **W. M. Benson.**

Kuffler, S. W., The two Skeletal Nerve-Muscle Systems in Frog. With 9 figures in the text 116

Kügelgen, B. von, s. **Pichotka, J.,** und **R. Damann.**

Langecker, H., A. Harwart und **K. Junkmann,** 2,4,6-Trijod-3-acetaminobenzoesäure-Abkömmlinge als Kontrastmittel 195

Loennecken, S. J., s. **Busse, W.**

Meier, R., s. **Tripod, J.,** und **W. Schuler.**

Møller, E., s. **Weidmann, H.**

Mülke, G., s. **Flacke, W.,** und **R. Schulz.**

Nacke, O., und **J. Steinmann,** Der Einfluß von Frauenharn und Follikelhormon auf den Bewegungstrieb infantiler weiblicher weißer Mäuse. Mit 4 Textabbildungen 219

Neuroth, G., K. Wezler und **G. Sieglitz,** Die Wirkung der Purine und ihrer Substituenten auf die Dynamik des isolierten, spontan schlagenden Froschherzens. Mit 6 Textabbildungen 378

Paas, E., s. **Hildebrandt, F.**

Philippot, E., et **M. J. Dallemagne,** Action des sels d'alkyl-triméthylammonium sur les muscles normaux et énervés du chat et du chien. Avec 10 figures. . 100

Pichotka, J., B. von Kügelgen und **R. Damann,** Die Bedeutung der Schilddrüse für die Temperaturregulation. Mit 8 Textabbildungen 398

Pick, E. P., H. L. Hollinck und **G. Zacharellis,** Über Hemmungs- und Potenzierungs-Phänomene am quergestreiften Muskel. Mit 5 Textabbildungen 83

Randall, L. O., J. Kruger, C. Conroy, B. Kappell and **W. M. Benson,** Peripheral effects of the optical antipodes of 3-Hydroxy-N-Methyl-Morphinan and some of their derivatives. With 4 figures in the text.. 26

Reinartz, W., s. **Hildebrandt, F.**

Reif, W., s. **Bönicke, R.**

Remy, R., s. **Gerlich, N.**

Rother, K., Über die Pathogenese verschiedener Formen experimenteller Nephritis. Mit 7 Textabbildungen 448

Schneider, R., s. **Koch, E., H. Bohn** und **F. Heiß.**

Schönberg, W. D. v., Beitrag zur Kenntnis des Natrium- und Kaliumstoffwechsels beim Leberparenchymschaden. Mit 4 Textabbildungen 338

Schroeder, W., s. **Klingmüller, V.**

Schuler, W., s. **Tripod, J.,** und **R. Meier.**

Schulz, R., s. **Flacke, W.,** und **G. Mülke.**

Semm, K., Die Standardisierung von Hypophysenhinterlappen-Extrakten am isolierten Rattenuterus. Mit 1 Textabbildung 477

Shutt, J. H., s. **Hanna, C.**

Seite

Sieglitz, G., s. **Neuroth, G.**, und **K. Wezler.**

Stahl, K. E., und **F. Jung**, Über Blutgiftwirkungen des Phenylendiamins und des Toluylendiamins. Mit 5 Textabbildungen 503

Steinmann, J., s. **Nacke, O.**

Taugner, R., und **W. Culp**, Über die Wirkung von Nicotin auf das Rückenmark der Katze. Einflüsse von Nicotin auf Patellarsehnen-, Flexor- und Extensorreflex vor und nach Zufuhr von Interneuronengiften. Mit 3 Textabbildungen 423

Theismann, H., s. **Brett, R.**

Ther, L., Über ein neues Leitungsanaesthetikum der „Nirvanin"-Reihe mit großer Entgiftungsgeschwindigkeit (Hostacain). Mit 12 Textabbildungen 300

Tripod, J., W. Schuler und **R. Meier**, Über die Herzwirkung eines Chinoxalinderivates im Vergleich zu g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure. Mit 15 Textabbildungen. 268

Vießmann, D., s. **Heubner, W.**

Vogt, W., Über die Beziehung des Darmstoffs zur Substanz. P 3. Mitteilung. Mit 3 Textabbildungen 365

Waldenström, J., ACTH und Cortisonwirkung bei Morbus Addison, zugleich eine Hypothese zur Erklärung der Adrenalinprobe der eosinophilen Zellen im Blute. Mit 5 Textabbildungen 69

Wegener, H., Über die Fortpflanzungsfähigkeit der Ratte nach Einwirkung von Diäthylenglykol. Mit 2 Textabbildungen 414

Weidmann, H., und **E. Moller**, Die Wirkung von Bienengift auf das Hypophysen-Nebennieren-System der Ratte 465

Weiss, U., s. **Davis, B. D.**

Wezler, K., s. **Neuroth, G.**, und **G. Sieglitz.**

Zacharellis, G., s. **Pick, E. P.**, und **H. L. Hollinck.**

Zipf, H. F., s. **Basold, A.**

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 1—15 (1953).

U.S. Public Health Service, Tuberculosis Research Laboratory,
Cornell University Medical College, New York 21, N. Y.

Aromatic Biosynthesis.

VIII. The Roles of 5-Dehydroquinic Acid and Quinic Acid* **.

By

BERNARD D. DAVIS and ULRICH WEISS.

(Eingegangen am 2. April 1953.)

Nutritionally deficient (auxotrophic) mutant strains of the mold *Neurospora crassa* were introduced by BEADLE and TATUM in 1941[1]. Similar mutants were subsequently obtained with bacteria, and it has recently been found possible to isolate them efficiently and conveniently through the use of penicillin as a selective agent[3, 13, 4]. These microbial mutants have been of great value in analyzing the path of biosynthesis of various metabolites[2, 5, 8].

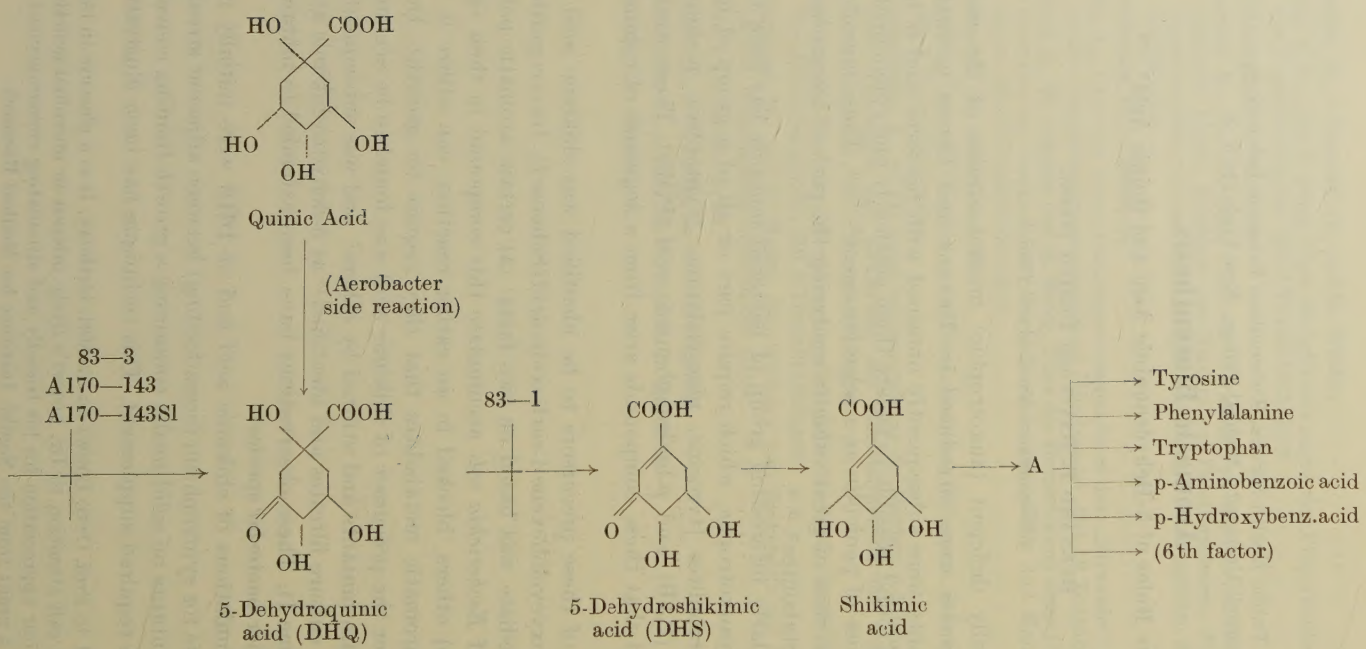
A particularly interesting group of bacterial mutants has been the aromatic polyauxotrophs, which require part or all of a group of five aromatic metabolites [tyrosine, phenylalanine, tryptophan, *p*-aminobenzoic acid (PAB), and *p*-hydroxybenzoic acid (POB)]. These strains have revealed that these compounds arise from a sequence of common precursors[9].

The first of these precursors to be identified was shikimic acid, a 3,4,5-trihydroxycyclohexene-1-carboxylic acid (Scheme 1). Its recognition as an intermediate was based on two facts: (a) certain aromatic polyauxotrophs of *Escherichia coli* accumulate this compound in their cultures, and (b) others, blocked in an earlier reaction, can utilize it to replace the aromatic metabolites that they require for growth[7]. In a similar manner the precursor of shikimic acid was found to be accumulated by certain mutants and utilized by others[7], and was subsequently isolated from culture filtrates and identified[15] as 5-dehydroshikimic acid (DHS) (Scheme 1). These observations have been extended to mutants of several other bacterial species[9].

The accumulations of shikimic acid and of DHS were initially revealed by tests for syntrophism (cross-feeding) between adjacent streaks of different mutants on solid media containing a growth-limiting concentration of the required supplement. This technique has been illustrated

* Dedicated to Prof. OTTO LOEWI on his 80th birthday. It is a pleasure to take this occasion to call attention to Dr. LOEWI's lively interest in microbial genetics, and to express our appreciation for his friendly and stimulating encouragement.

** Aided by a grant from the Squibb Institute for Medical Research.



Scheme 1. Proposed scheme of aromatic biosynthesis. The unknown 6th factor is required for growth only under special conditions (8) which have not been used in the present work.

elsewhere[5]. Similar attempts to demonstrate accumulation of still earlier precursors were long unsuccessful, even though a large number of aromatic polyauxotrophs were collected and tested; all those blocked before DHS appeared to be blocked in the same reaction, since they were fed by mutants with later blocks but did not feed each other.

However, these experiments were performed on a medium which was imperfectly suited for the detection of aromatic precursors. This medium contained a quintuple aromatic supplement in which the three α-amino acids were all present in low concentration, and subsequent experiments revealed that these three requirements were not equally readily satisfied by a common precursor. Thus mutants blocked immediately before shikimic acid could use this compound to replace tryptophan, PAB, and POB, but not to replace tyrosine or phenylalanine. This limitation was traced to the following mechanism[10]: (a) these mutants accumulate DHS heavily; (b) this compound competitively inhibits the utilization of shikimic acid; and (c) with increasing inhibition the various aromatic syntheses are eliminated in a fixed order, tyrosine and phenylalanine being the first to be lost.

It seemed possible that mutants with earlier blocks might exhibit a similar internal inhibition, which would also interfere more strongly with tyrosine and phenylalanine synthesis than with that of tryptophan. Accordingly, these mutants were retested on a quintuply supplemented medium in which only tryptophan was limiting. It then became possible, as this paper will show, to recognize that certain strains blocked before DHS accumulate a compound to which others can respond. This compound has been isolated and identified[17] as 5-dehydroquinic acid (DHQ). Its position in the sequence of aromatic biosynthesis is indicated in Scheme 1.

In addition, mutants of *Aerobacter aerogenes* that can respond to DHQ were found to respond also to a closely related compound, quinic acid (Scheme 1). Evidence will be presented, however, that quinic acid is not necessarily a normal intermediate in aromatic biosynthesis in bacteria.

Experimental.

Methods. The isolation of the mutants and the cultural and chromatographic methods used have been described[7, 9]. The minimal medium used (Medium A)[6] contained glucose (0.5%), citrate, and inorganic salts, and was solidified by the addition of 1.5 per cent agar. Cultures were incubated at 35° C.

Results.

Recognition of Compound W (5-dehydroquinic acid). The 18 available mutants of *E. coli* and *A. aerogenes* blocked before DHS have been listed elsewhere ([9] Table 1). These strains were tested against each other for

syntrophism on quintuply supplemented media in which only tryptophan was limiting (0.1 to 1.0 μg/ml). They were found to fall into two classes, represented by 83—1 and 83—3; any member of either class exhibited syntrophism with any member of the other class, but with no member of its own class. Culture filtrates of members of the 83—1 class were then found to contain growth factor activity for members of the 83—3 class. The active substance appeared on bioautography (paper chromatography with microbiological detection) as a single spot, and was provisionally designated as Compound W.

Compound W (in filtrates of 83—1) was found to be readily converted to DHS by growing cultures*, non-growing cell suspensions (Table 1), or cell-free extracts of wild-type *E. coli* or mutant 83—3. This enzymic reaction will be described elsewhere[14]. In addition, the same conversion could be effected by heating W-containing filtrates with dilute acid at 100° for a few minutes (Table 1). The DHS formed was identified by

Table 1.

Chromatographic evidence for the conversion of Compound W to 5-dehydroshikimic acid.

Chromatograms were run simultaneously on a filtrate containing Compound W, one containing DHS, the Compound W filtrate autoclaved for 10 minutes with an equal volume of 1 N HCl, and the same filtrate incubated at 37° for two hours with an equal volume of a washed suspension of wild-type *E. coli* cells. The positions of the spots were determined by bioautography with strain A170—143S1 in minimal medium supplemented with tyrosine, phenylalanine, and tryptophan.

Substance chromatographed	Solvent	
	BuOH-Formic	Phenol-H_2O
	R_f values	
Compound W	0.19	0,30
5-Dehydroshikimic acid	0.44	0.45
Acid-treated W	0.45	0.49
Bacteria-treated W	0.50	0.47

paper chromatography (Table 1), specific mutant response, alkali lability, interference with ultraviolet fluorescence on paper chromatograms, and competitive interference with shikimic acid utilization by appropriate mutants.

A mutant (A170—143) of *A. aerogenes* behaved in a somewhat different manner from the *E. coli* mutants. When this strain and a DHQ-

* The fact that growing cells of strain 83—3 can rapidly convert DHQ to DHS in excess of the amounts assimilated explains the initially puzzling observation that syntrophism between strains 83—1 and 83—3 was mutual. Though mutual syntrophism is theoretically possible whenever a mutant feeds a precursor to another mutant blocked earlier in the same sequence, we have observed no other case nearly as striking as this one, in which the secondary feeding appeared almost as early as the primary.

excreting strain (*E. coli* mutant 83—1) were streaked next to each other on a medium limiting in tryptophan and then incubated for two to three days, A170—143 developed a number of scattered large colonies rather than the usual uniform gradient of a syntrophic response. These clones, when isolated and retested, proved to be secondary mutants that responded uniformly and rapidly to adjacent streaks of 83—1. Apparently strain

Table 2.

Growth of mutants on solid media.

The three strains were streaked on each plate of solid medium supplemented as indicated. DHS and DHQ were sterilized by filtration; the other compounds were autoclaved. "Ty + ph" denotes minimal medium supplemented with L-tyrosine 20 μg/ml + DL-phenylalanine 40 μg/ml. Readings of growth after incubation at 35° range from m (microscopic), ½ (barely visible), and 1 (visible through the agar) to 4 (full growth). Irr = irregular growth. Asterisk (*) indicates presence of scattered arger colonies of secondary mutants.

Medium	Supplement μg/ml	Mutant					
		83−3		A 170−143		A 170−143 S 1	
		Growth at 24 and 48 hours					
Minimal	None	0	0	0	0	0	0
	Shikimic 5	m irr	m irr	m irr	1*	m irr*	1*
	50	m irr	m irr*	m irr	2*	m irr*	2*
	200	m irr	m irr*	m irr	1*	m irr*	2*
	DHS.H_2O 5	m irr	m irr*	m irr	1*	m irr	1*
	50	m irr	m irr*	m irr	2*	m irr	2*
	200	m irr	m irr*	m irr*	2*	m irr*	2*
	DHQ 5	0	0	0	0	1	2
	50	m	m	0	0	3	4
	200	m	½	m	½*	4	4
	Quinic 5	0	0	0	0	1	2
	50	0	0	0	0*	3	4
	200	0	0	0	m*	4	4
Ty + ph	None	0	0	0	0	0	0
	Shikimic 1	1	1	2	2	2	2
	10	3	4	4	4	4	4
	100	3	4	4	4	4	4
	DHS.H_2O 1	1	1	2	2	2	2
	10	3	4	4	4	4	4
	100	3	4	4	4	4	4
	DHQ 1	0	0	0	0	1	1
	10	m	½	m	½*	3	4
	100	1	3	2*	2*	4	4
	Quinic 1	0	0	0	0	1 irr	2 irr
	10	0	0	0	0	3	4
	100	0	0	2*	3 irr	4	4

A170—143 is blocked before DHQ but for a good response to this substance it requires a secondary mutation, which will be discussed below. This mutation occurs with high frequency. One such secondary mutant, A170—143 S1, has been used for assay during the isolation of DHQ.

Response to 5-dehydroquinic acid; secondary mutations. Because of the ready emergence of secondary mutants with improved growth responses to the compounds under investigation, experiments on solid media (in which such secondary mutants can be distinguished from the parental strain) are presented, as well as more precise turbidimetric experiments in liquid media*.

Table 2 shows that on the usual solid medium *E. coli* strain 83—3 and Aerobacter strain A170—143 respond rather poorly to shikimic acid or DHS as sole supplement, and hardly detectably to DHQ. In the presence of tyrosine and phenylalanine, however, they give a good response to "physiological" concentrations of shikimic acid or DHS; but their response to DHQ is still slow and requires a very high concentration**.

Against the background of poor growth on shikimic acid or DHS both strains give rise to scattered larger colonies. On isolation these have proved to be secondary mutants (S2 type) with a normal rate of growth on these substances. No distinction could be observed between the secondary mutants isolated on shikimic acid and those isolated on DHS. It thus appears that there is a single type of secondary mutation in strains blocked before DHQ which releases a limitation in their response to either shikimic acid or DHS. The growth response of one such secondary mutant, A170—143 S2, is presented later (Table 4).

Against the background of poor growth on DHQ (with or without tyrosine and phenylalanine) the Aerobacter mutant similarly gives rise to secondary mutants. A typical one of these, A170—143 S1, was isolated and tested for its growth responses. Table 2 shows that it not only grows as well on DHQ as on DHS or shikimic acid in the presence of tyrosine and phenylalanine, but in their absence it grows even better on DHQ than on its metabolic successors. This surprising result will be discussed below.

The S1 type of secondary mutation is distinct from the S2 type; the former leads to marked improvement of growth on DHQ without improvement on DHS or shikimic acid, while the latter has the converse effect. Both types can coexist in the same strain; examples are noted in

* Responses to quinic acid are included for purposes of conciseness in the tables presented in this section and will be discussed below.

** Since traces of DHS are present in the unstable DHQ or can arise from it during incubation, control assays for DHS with strain 83-1 were simultaneously carried out under the same conditions. These showed that the observed response of strains 83-3 and A 170-143 to high concentrations of DHQ could not be accounted for by the DHS present.

Table 3. *Growth of mutants in liquid media.*

Ten ml volumes of liquid medium in test tubes of 22 mm diameter were supplemented as indicated and inoculated with 10^{-2} ml of a fresh culture. After incubation at 35° turbidity was read in an Evelyn photoelectric colorimeter, 540 mμ filter. R denotes tubes outgrown by reversions. "Ty + ph" denotes minimal medium supplemented with L-tyrosine 20 μg ml + DL-phenylalanine 40 μg/ml.

The molecular weights of the compounds tested are: shikimic acid 174, DHS · H_2O 190, DHQ 190, quinic acid 192.

Medium	Supplement μg/ml	Mutant					
		83−1		83−3		A 170−143 8 1	
		Optical density (× 100) at 24 and 48 hours					
Minimal	None	0	0	0	0	0	0
	Shikimic . . . 20	4.8	5.5	0.4	3.6	4.1	5.1
	50	9.7	9.4	0.9	6.6	7.1	7.3
	100	13.7	14.0	1.3	15.5	12.2	11.6
	DHS · H_2O . . 20	3.9	3.9	0.7	3.2	2.5	2.7
	50	9.2	9.7	2.0	8.9	6.1	5.8
	100	16.1	15.8	2.5	12.8	12.5	11.4
	DHQ 20	—	—	0	0	3.6	3.9
	50	—	—	0	0	7.1	7.1
	100	0	0	0	0.9	9.7	9.2
	Quinic 20	—	—	0	0	2.9	3.6
	50	—	—	0	0	6.8	6.6
	100	0	0	0	0	8.4	8.4
Ty + ph	None	0	0	0	0	0	0
	Shikimic . . . 2	2.7	2.9	3.6	R	2.7	4.1
	5	9.4	11.1	8.6	8.4	8.1	10.2
	10	16.8	15.5	17.1	14.9	15.5	17.4
	20	20.8	23.7	21.1	23.7	22.5	28.4
	DHS · H_2O . . 2	3.6	3.9	3.2	2.9	3.2	3.6
	5	7.6	9.2	8.1	8.1	8.4	9.7
	10	14.9	14.3	13.7	11.6	13.7	R
	20	17.0	18.4	19.4	20.1	20.1	23.7
	DHQ 2	—	—	0	0	0.9	3.2
	5	—	—	0	0	7.3	8.1
	10	—	—	0	0	9.7	9.7
	20	0	0	0	0.4	11.9	12.2
	Quinic 2	—	—	—	—	0.9	2.9
	5	—	—	—	—	7.3	8.1
	10	—	—	—	—	9.7	9.2
	20	0	0	0	0	11.9	11.4
	Quinic . . . 2000	—	—	0	0	40.9	41.7
	Quinic . . . 2000	—	—	22.9	21.8	—	—
	Shikimic . . 20						
	Quinic . . . 2000	—	—	19.7	19.7	—	—
	DHS · H_2O . 20						

Table 2 to have appeared from secondary mutant A170—143 S1 as scattered large colonies on shikimic acid or DHS.

E. coli mutant 83—3, in contrast to Aerobacter mutant A170—143, failed to give rise to spontaneous secondary mutants that grew well on DHQ. A number of other *E. coli* mutants blocked before DHQ were therefore similarly tested, and they yielded the same results. However, by means of ultraviolet irradiation followed by intermediate cultivation (for purposes of phenotypic development; cf.[5]) it proved possible to isolate secondary mutants from 83—3 with improved response to DHQ. These were not a full S1 type of mutant, since they did not grow at full rate on DHQ alone; but some of them could grow at almost full rate on DHQ in the presence of tyrosine and phenylalanine. The growth response of one such mutant, strain 83—3S21, is presented later (Table 4).

The results of turbidimetric studies in liquid media are in harmony with those obtained on solid media. A typical experiment is presented in Table 3. For purposes of comparison an *E. coli* mutant with a later block, 83—1, is included. It is seen that 83—3 grows more slowly than this strain or Aerobacter mutant A170—143 S1 on shikimic acid or DHS, but in the presence of tyrosine and phenylalanine these strains resemble each other closely in their responses to these substances. With DHQ A170—143S1 responds well but the response of 83—3 is barely detectable, and 83—1, as would be expected from the position of its block, does not respond at all. Results obtained with the primary Aerobacter mutant A170—143 are not included; this strain did not differ significantly from A170—143S1 except for a delay in response to DHQ, and the turbidity obtained on DHQ could be shown to be due to secondary mutants of the S1 type.

It may be noted that the response of A170—143S1 to DHQ differs from the response to shikimic acid or DHS. At low concentrations (2 μg/ml) the response to DHQ is slow; and though the response to DHQ at 5 μg/ml is rapid and only moderately lower than that to the other compounds, at higher concentrations the level of response to DHQ falls off sharply.

Response to quinic acid. In the course of studies on the chemical conversion of DHQ to quinic acid[17] it was found that mutant A170—143S1 responds just as well to the latter compound as to the former. Tables 2 and 3 show that this is true not only in the presence of tyrosine and phenylalanine but also in their absence; and quinic acid also resembles DHQ in its low activity for the parent strain A170—143 on the usual medium.

It has not been possible to separate the improved response of Aerobacter secondary mutants to DHQ from that to quinic acid; all the secondary clones isolated on either substance have responded well to the other. It thus appears that just as a single type of secondary mutation

(S2) strikingly improves the response of certain mutants to either shikimic acid or DHS, so another type (S1) has this effect on the response of an Aerobacter mutant to either quinic acid or DHQ.

In contrast to Aerobacter, *E. coli* mutants of the S3—3 group, though able to respond slowly to DHQ, do not respond to quinic acid even in very high concentrations and in the presence of tyrosine and phenylalanine (Tables 2, 3). This inactivity does not appear to be due to an inhibitory effect, as quinic acid does not interfere with the response of strain S3—3 to DHS or shikimic acid (Table 3).

E. coli mutant S3—3 failed, even when tested in large numbers after ultraviolet irradiation plus phenotypic development, to yield secondary mutants that could respond to quinic acid.

Effect of carbon sources. It was previously observed[7] that the keto acid corresponding to tyrosine was practically inactive as a replace-

Table 4. ***Effect of carbon source on response to growth factors.***

Experiment performed and scored as in Table 2. Glucose omitted from medium containing succinate. Strain S3-3 S 21 was derived from S3-3, and A 170-143 S 1 from A 170-143, in the presence of DHQ; strain A 170-143 S 2 was derived from A 170-143 in the presence of shikimic acid.

Carbon-Source (0.5%)	Medium	Supplement (2 mM)		Mutant							
				S3—3		S3—3 S21		A 170 —143		A 170 14381	A 170 14382
				Growth at 24 and 48 hours							
Glucose	Minimal	Shikimic	30	½	½*	½	½*	2 irr	½*	2*	½* 2* 4 4
		DHS·H_2O	30	½	½*	½	½*	2	½*	2*	½* 2* 4 4
		DHQ	30	0	m	½	2	0	m*	4 4	m* m*
		Quinic	30	0	0	0	0	m*	m*	4 4	m* m*
	Ty + ph	None		0	0	0	0	0	0	0 0	0 0
		Shikimic	10	4	4	4	4	4	4	4 4	4 4
		DHS·H_2O	10	4	4	4	4	4	4	4 4	4 4
		DHQ	10	½	1	3	4	½*	1*	4 4	½* 1*
		Quinic	10	0	0	0	0	½*	½*	4 4	½* ½*
Na succinate	Minimal	Shikimic	30	½	2 irr	½	3	½	2	½*	4* 2 3
		DHS·H_2O	30	½	2 irr	½	3	½	2	½*	1* 2 3
		DHQ	30	0	m	½	2	½*	½*	2 3	½* ½*
		Quinic	30	0	0	0	0	2	3	2 3	2 3
	Ty + ph	None		0	0	0	0	0	0	0 0	0 0
		Shikimic	10	3	4	2	4	3	4	3 4	3 4
		DHS·H_2O	10	3	4	2	4	3	4	3 4	3 4
		DHQ	10	½	½	2	4	3	4	3 4	3 4
		Quinic	10	0	0	0	0	3	4	3 4	3 4

ment for tyrosine in the usual medium (with glucose as carbon source), but became highly active when glucose was replaced by lactate or succinate. Accordingly, similar tests were carried out in relation to the present problem. Table 4 shows that DHQ is much more active for A170—143 (in the presence of tyrosine and phenylalanine) on succinate than on glucose. Furthermore, the effect on quinic acid utilization was even greater; in fact, on succinate A170—143 responded to quinic acid (even in the absence of tyrosine and phenylalanine) just as well as A170—143S1 did. In contrast, this shift of carbon source exerted no significant effect on the response of 83—3 to DHQ, and slightly improved its response to DHS or shikimic acid.

It was further found that lactate had essentially the same effect as succinate, and gluconate the same effect as glucose. D-xylose and D-mannitol acted much like glucose, except that they supported an improved response of A170—143 to quinic acid, but not to DHQ. Finally, the addition of a low concentration of glucose (0.01%) reversed the growth-promoting effect of succinate. A similar reversal has been observed with another growth-promoting effect of succinate ([9] Table 6).

Search for accumulation of quinic acid. The growth responses to quinic acid, and the fact that this compound differs from DHQ only by two hydrogen atoms, suggested that quinic acid might be the immediate precursor of DHQ, strain 83—3 being blocked between the two compounds and A170—143S1 being blocked in an earlier reaction. If such were the case 83—3 would be expected to accumulate quinic acid, since all the strains with later blocks in this aromatic sequence accumulate precursors of their blocked reactions, often in concentrations up to 600 μg/ml. However, under a variety of circumstances strain 83—3 failed to accumulate any growth factor for strain A170—143S1, as shown by direct tests for syntrophism and by bioautographs with a culture filtrate. The bioautographs would have detected less than 1 μg/ml of quinic acid.

Accumulation of quinic acid thus seems excluded for *E. coli*. This fact is in harmony with the failure of any mutants of this species to utilize this compound. But since an Aerobacter mutant can, in contrast, utilize quinic acid, the possibility remains that in this species this compound might be an intermediate, and hence might be accumulated by a mutant blocked between it and DHQ. However, no such mutant of Aerobacter has been encountered, despite a search by the penicillin method: two more mutants that responded slowly to DHQ were obtained, but they also responded slowly to quinic acid and they yielded secondary mutants that responded well to either compound.

It has further been noted that Aerobacter or *E. coli* mutants blocked in later reactions in this series accumulate not only large amounts of the substrate of the blocked reaction, but also small amounts of earlier inter-

mediates, detectable on chromatograms[9]. Accordingly, filtrates of Aerobacter and *E. coli* mutants blocked in each of the known later reactions were tested chromatographically with strain A170 -143S1. Again, no quinic acid was found, though traces of DHQ were. The methods used are described in a later section.

Utilization of quinic acid by the wild types. Despite the failure of any *E. coli* mutants to utilize or accumulate quinic acid, the possibility remained that this compound might be an intermediate in this species, in a reaction too early to be detectable with any of the available mutants. If so, one might expect that growing wild-type cells could assimilate it as well as they could assimilate other intermediates in this series. However, Table 5 shows that growing cultures of wild-type *E. coli* (strain W) did not detectably remove added quinic acid from the medium, though they removed shikimic acid. Growing wild-type Aerobacter, in contrast, removed quinic acid even faster than shikimic acid from the medium (Table 5). It is of interest to note further that the amount of shikimic acid removed by *E. coli* (20 μg/ml) is approximately that which would be required to support full growth of a mutant completely blocked in aromatic synthesis, whereas Aerobacter removed all the shikimic acid or quinic acid added (50 μg/ml).

Table 5. *Removal of quinic acid and shikimic acid from the medium.*

15 ml tubes of minimal medium, supplemented with 50 μg/ml of shikimic acid or quinic acid, were inoculated with a loopful of wild-type Aerobacter or *E. coli* and incubated at 35°; heavy growth was reached at 1 day. Samples taken at 0, 24, and 48 hours were centrifuged and assayed for shikimic acid with strain 83-1, and for quinic acid with strain A 170-143 S 1.

Inoculum	Supplement	Time (hours)	Shikimic acid (μg/ml)	Quinic acid (μg/ml)
E. coli	Shikimic	0	50	—
		24	27	—
		48	30	—
	Quinic	0	—	50
		24	—	50
		48	—	50
Aerobacter	Shikimic	0	50	—
		24	20	—
		48	0	—
	Quinic	0	—	50
		24	—	0
		48	—	0

On a medium containing a high concentration of DHQ streaks of wild-type Aerobacter or *E. coli* fed adjacent streaks of a strain (83—1) blocked immediately before DHS; presumably this feeding depended on

conversion of DHQ to DHS. When quinic acid was substituted for DHQ similar feeding was observed with wild-type Aerobacter, but not with *E. coli*. All these results indicate that *E. coli*, in contrast to Aerobacter, cannot metabolize quinic acid.

Assay of 5-dehydroquinic acid and quinic acid. Tabel 3 shows that DHQ or quinic acid can be assayed with strain A170—143S1. These assays, however, yield a curve which rapidly flattens off with increasing concentration; they are therefore less satisfactory than the assays for shikimic acid or DHS. DHQ can be more precisely and rapidly assayed by another method, to be described elsewhere[14], which is based on enzymic conversion to DHS and measurement of the ultraviolet absorption of the latter compound.

Disk assays with A170—143S1, on solid media supplemented with tyrosine and phenylalanine, have been particularly helpful in the isolation of 5-dehydroquinic acid. It is of interest that these assays reflect the above-noted differences in the shape of the curve of response to various growth factors in liquid media: the border of the area of response in disk assays is exceptionally sharp with quinic acid or DHQ, and is diffuse with DHS or shikimic acid.

In the detection of quinic acid or DHQ in biological materials bioautography (Table 1), and differential assay with mutants with later blocks, are both helpful in distinguishing these compounds from DHS, shikimic acid, and mixtures of aromatic metabolites. If the medium is supplemented with tryptophan as well as tyrosine and phenylalanine only PAB and POB need be replaced, and the bioautographic test becomes sensitive to as little as 0.01 μg of quinic acid or DHQ.

DHQ was found to have about the same chromatographic mobility as quinic acid both in butanol-formic acid and in phenol-water. The two compounds, however, can readily be differentiated on the basis of sensitivity to alkali. Autoclaving at 120° C for 10 minutes in 0.1 N NaOH destroys DHQ (or DHS) completely, and does not affect quinic acid (or shikimic acid). Similarly, on developed paper chromatograms DHQ could be destroyed, without affecting quinic acid, by exposure to concentrated ammonia vapor overnight.

Though DHQ is converted to DHS on boiling with acid, it could be adequately sterilized for purposes of assay, without significant conversion or destruction, by heating at 65° for 10 minutes in dilute acid (0.1 HCl)*.

---

* It may be of interest to note that the procedure reported here can be adapted to assay chlorogenic acid, a depside of quinic acid and caffeic acid which has recently been reported to play a role in the resistance of a plant to fungal infection[12]. Chlorogenic acid itself is inactive as a growth factor for A 170-143 S 1, but on alkaline hydrolysis it yields the amount of activity anticipated from its content of quinic acid. Hydrolysis is complete after 5 min at 100° in 0.01—0.1 N NaOH.

Discussion.

5-Dehydroquinic acid (DHQ) satisfies the criteria for an intermediate in aromatic biosynthesis in *E. coli* and Aerobacter: it is accumulated by certain mutants, is utilized as a growth factor by others, and is effective in amounts approximately equivalent to the aromatic metabolites it replaces. Nevertheless, it should be noted that the primary mutants blocked before DHQ, derived by one step from the wild type, respond only very poorly to this compound on the usual medium; for good response a secondary mutation is necessary. However, this limitation of response of the primary mutants differs only in degree from the limitations they exhibit with DHS and shikimic acid, and the latter limitations can also be eliminated by secondary mutations. Furthermore, a change in carbon source (from glucose to lactate or succinate) allows the primary mutant of Aerobacter to respond quite well to DHQ. Finally, the mutants blocked before DHQ, as well as wild-type Aerobacter and *E. coli*, yield cell-free extracts which readily convert DHQ to DHS; this enzymatic activity is absent from the extracts of completely blocked mutants that accumulate DHQ (e. g., 83—1); and the reaction is mediated by an enzymatic system that requires no cofactors and hence seems unlikely to involve more than one enzyme[14]. There seems, therefore, to be little doubt that DHQ is indeed a normal biosynthetic intermediate.

Aerobacter mutants that respond to DHQ respond equally well to quinic acid, and the wild type can be shown to metabolize either compound. This fact, and structural considerations, suggest that quinic acid might be the immediate precursor of DHQ in this organism. Nevertheless, the critical evidence — a mutant blocked between the two compounds, which would accumulate one and utilize the other — could not be obtained. Furthermore, mutants with later blocks accumulate not only large amounts of the substrate of the blocked reaction but also traces of the earlier intermediates, yet they could not be shown to accumulate quinic acid. Finally, the close relationship between Aerobacter and *E. coli* suggests that they would have identical biosynthetic paths, yet quinic acid cannot be implicated in aromatic biosynthesis in *E. coli*: no available mutants of this species accumulate it or respond to it, and it cannot be metabolized by the wild-type, which can metabolize the known intermediates in this biosynthetic sequence. It therefore seems best at present not to assign quinic acid a position as a normal intermediate in aromatic biosynthesis, but rather to consider it provisionally as a non-essential compound which Aerobacter has the ability to convert into DHQ (Scheme 1).

This interpretation is in harmony with the further observation that wild-type Aerobacter can metabolize quinic acid (as well as shikimic

acid) in amounts exceeding any possible assimilation into aromatic metabolites. Aerobacter must therefore have a degradative path for these substances. The evolutionary development of such a path might well be related to the fact that one natural habitat of Aerobacter is the surface of vegetation, in which quinic acid is widely distributed[16].

Quinic acid was suggested earlier as a possible intermediate in aromatic biosynthesis when it was found to support the growth of a Neurospora mutant[11]. The evidence for its function as a normal intermediate in this species, however, is even less convincing than the evidence from Aerobacter: the concentrations required were very large (up to 5000 μg/ml) and the mutant was an atypical one which responded to a variety of aromatic compounds, including some of unproved metabolic function.

The availability of a sensitive microbiological assay for quinic acid or its derivative, chlorogenic acid, may be useful to students of plant physiology in view of the wide distribution of these compounds. The flat response curve of strain A170—143S1 to quinic acid or DHQ, compared with its response to DHS or shikimic acid, probably involves degradative reactions that compete with assimilatory ones, but may also depend on inhibitory effects similar to those between DHS and shikimic acid discussed in the introduction.

The mechanisms by which secondary mutations and changes of carbon source affect the response to DHQ and related compounds are under investigation. (Particularly interesting problems are presented by the better response of S1 secondary mutants to quinic acid or DHQ than to their metabolic successors, and the better response, on certain carbon sources, of Aerobacter A170—143 to quinic acid than to DHQ.) In a similar case, in a mutant with a later block, secondary mutations to improved growth have been shown to act through eliminating inhibition by an accumulated intermediate[10], but preliminary experiments suggest that the present cases may involve other mechanisms, such as permeability changes.

It is a pleasure to acknowledge the excellent technical assistance of Elizabeth S. Mingioli and Virginia C. Littau.

Summary.

Certain mutants of *E. coli* and *A. aerogenes* require for growth a group of five aromatic metabolites (tyrosine, phenylalanine, tryptophan, *p*-aminobenzoic acid, and *p*-hydroxybenzoic acid). Some of these strains accumulate 5-dehydroquinic acid (DHQ) in their culture filtrates, and others can utilize this compound as a growth factor. The latter group of strains exhibit a very limited response to this compound, and a less limited response to its metabolic successors, 5-dehydroshikimic acid and shikimic acid; but these strains yield various types of secondary mutants

that respond well to these intermediates. Furthermore, replacement of glucose by lactate or succinate as carbon source leads to good response of the Aerobacter mutant to DHQ without the need for a secondary mutation. It is concluded that DHQ is a normal intermediate in aromatic biosynthesis.

The Aerobacter mutants that can utilize DHQ respond equally well to quinic acid. Evidence is presented, however, that quinic acid is not a metabolite in *E. coli*, and even in Aerobacter may be used through a side reaction rather than a normal biosynthetic step.

References.

[1] Beadle, G. W., and E. L. Tatum: Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **27**, 499 (1941). — [2] Beadle, G. W.: Physiologic. Rev. **25**, 643 (1945). — [3] Davis, B. D.: J. Amer. Chem. Soc. **70**, 4267 (1948). — [4] Davis, B. D.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **35**, 1 (1949). — [5] Davis, B. D.: Experientia **6**, 41 (1950). — [6] Davis, B. D., and E. S. Mingioli: J. Bacter. **60**, 17 (1950). — [7] Davis, B. D.: J. of Biol. Chem. **191**, 315 (1951). — [8] Davis, B. D.: Symposium on Microbial Metabolism, 2nd International Congress of Biochemistry. Paris **5**, 32 (1952). — [9] Davis, B. D.: J. Bacter. **64**, 729 (1952). — [10] Davis, B. D.: J. Bacter. **64**, 749 (1952). — [11] Gordon, M., F. A. Haskins, and H. K. Mitchell: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **36**, 427 (1950). — [12] Johnson, G., and L. A. Schaal: Science **115**, 627 (1952). — [13] Lederberg, J., and N. Zinder: J. Amer. Chem. Soc. **70**, 4267 (1948). — [14] Mitsuhashi, S., and B. D. Davis: Manuscript in preparation. — [15] Salamon, I. I., and B. D. Davis: Unpublished observations. — [16] Wehmer, C., W. Thies, and M. Hadders: in Klein, G., Handbuch der Pflanzenanalyse, Vienna **2**, 545 (1932). — [17] Weiss, U., B. D. Davis, and E. S. Mingioli: J. Amer. Chem. Soc.,in press.

Dr. Bernard D. Davis, Cornell University Medical School, Tuberculosis Research Laboratory, New York 21, N. Y./USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 16—25 (1953).

Aus dem „Department of Pathology" und dem „Institute for Research in Animal Diseases" der Columbia Universität, New York, N. Y.

Studien über die Ernährung von Ratten mit hochoxydierten Fetten*.

Von

HANS KAUNITZ.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Februar 1953.)

Das Schrifttum über die biologischen Wirkungen hochoxydierter Fette ist ganz außerordentlich widerspruchsvoll und unübersichtlich. Die meisten Autoren, die im Tierversuch sogenannte ranzige Fette verwendeten, beobachteten eine ganze Reihe von schweren Veränderungen, sogar die Entwicklung von bösartigen Geschwülsten wurde mitgeteilt. In der Mehrzahl der Versuche wurde jedoch gefunden, daß junge Ratten an einer ranziges Fett enthaltenden Kost bald zu wachsen aufhören, daß sie anämisch werden und nach einigen Wochen eingehen (BARNES u. Mitarb.; QUACKENBUSH).

Kritische Sichtung der meisten dieser Untersuchungen zeigt zunächst, daß der Ausdruck ranziges Fett für die meisten der in den Tierversuchen verwendeten Fette nicht gebraucht werden sollte. Obzwar es nicht möglich ist, eine irgendwie präzise chemische oder physikalische Definition von dem zu geben, was der gewöhnliche Sprachgebrauch als ranziges Fett bezeichnet, handelt es sich bei den im Tierversuch verwendeten Fetten um Materialien, die selbst unter Ausnahmszuständen von Menschen nicht genossen werden könnten. Die Oxydation der experimentell verwendeten Fette ist gewöhnlich durch wochenlanges Erhitzen und Sauerstoffdurchleitung so weit gediehen, daß man die Bezeichnung ranzig vermeiden und von hochoxydiertem Fett sprechen sollte. Solchen Überlegungen kommt deswegen einige Bedeutung zu, weil Ergebnisse der im Tierversuch mit hochoxydierten Fetten gewonnenen Erfahrungen bewußt oder unbewußt auf den Menschen übertragen wurden, wozu nur geringe Berechtigung besteht. Da für die Überzahl der experimentellen Untersuchungen besonders Schweinefett wegen seiner Billigkeit und leichten Oxydierbarkeit verwendet wurde, kam gerade dieses Fett ganz unberechtigt in schlechten Ruf, ob zwar dieses Fett in seiner oxydierten Form vielleicht weniger toxisch ist als Pflanzenfette.

In bezug auf den Menschen liegen im Schrifttum bisher keinerlei Beweise dafür vor, daß ranziges, nicht bakteriell verunreinigtes Fett giftig ist; die unerwünschten Einflüsse von solchen Fetten auf Geruch und Geschmack sowie dadurch bedingte Magenirritationen haben mit der Frage von seiner toxischen Wirkung nichts zu tun.

* OTTO LOEWI zum achtzigsten Geburtstage gewidmet.

Die Widersprüche im Schrifttum sind zum großen Teil dadurch zu erklären, daß die vitaminzerstörenden Eigenschaften oxydierter Fette vielfach nicht genügend beachtet wurden, obzwar dies von chemischer Seite wiederholt betont worden war (Riemenschneider u. Ault und viele andere). So kam es, daß Mangelkrankheiten verschiedenen Grades auftraten, wenn die Vitamine gemeinsam mit dem oxydierten Fett der Kost zugesetzt wurden. Die beobachteten Erscheinungen wurden in Unkenntnis des Sachverhaltes dahin gedeutet, daß das oxydierte Fett entweder hochtoxische Stoffe enthalten müsse oder daß es ihm an bisher unbekannten Vitaminen fehle.

Wir haben uns mit der Wirkung von hochoxydiertem Schweinefett seit mehreren Jahren beschäftigt [Kaunitz u. Slanetz (1)]; Stoerk, Kaunitz u. Slanetz; Kaunitz, Johnson u. Slanetz). Wenn wir den Tieren alle bekannten Ernährungsfaktoren als Suspensionen separat zufütterten, fanden wir überraschend geringe Veränderungen, selbst wenn die verwendeten Fette hochgradig oxydiert waren.

Methoden.

Albino-Ratten von einer uns seit zehn Jahren bekannten, recht homogenen Kolonie wurden verwendet. Die Jungen von etwa 30 Würfen wurden ein bis drei Tage nach der Geburt vereinigt und in Männchen und Weibchen geschieden. Die Muttertiere erhielten dann entweder 9 schwerere oder 7 leichtere Junge des gleichen Geschlechtes. Zur gleichen Zeit wurden sie an eine hochgereinigte Kost gesetzt, deren Vorteile für die Aufzucht von Ratten vor einiger Zeit beschrieben wurde (Kaunitz). Diese Kost bestand aus 30% Laktalbumin, 10% Baumwollsamenöl, 4% Salzmischung, 2% Celluration (Cellulose), 54% Cerelose (Zucker). Die folgenden Substanzen wurden der Diät zugesetzt (in Milligrammen per Kilogramm Diät): Calcium carbonat 5000, Inositol 1000, Cholin 1000, Para-aminobenzoesäure 300, Nicotinsäure 100, Calcium Pantothenat 10, Thiaminchlorid 2, Riboflavin 4, Pyridoxin, Folsäure 2, Biotin 0,025, Vitamin B^{12} 0,005, Vitamin C 25, Alpha-Tocopherol 55, Vitamin K 10, Vitamin D 0,01[1].

Wenn die Jungen 21 Tage alt waren, wurden sie abgestillt und gewogen. Am 28. Tage wurde ihr Gewicht wieder bestimmt; zu schwere oder zu leichte Tiere wurden verworfen. Der Rest wurde in Gruppen derart eingeteilt, daß die Durchschnittsgewichte aller Gruppen am 21. und dann wieder am 28. Tage identisch waren. Dies machte es außerordentlich unwahrscheinlich, daß spätere Gewichtsunterschiede durch verschiedene Wachstumstendenz der Gruppen bei ihrer Zusammenstellung bedingt waren.

Zur gleichen Zeit wurden den Gruppen gewöhnlich die experimentellen Diäten verabreicht; diese enthielten 20% Fett, 2% Celluration (Cellulose), 4% der für Ratten üblichen Salzmischung und Eiweiß und Cerelose (Zucker) im jeweils erwünschten Verhältnis. Vitamin K, Cholin, Nicotinsäure, Para-aminobenzoesäure und Inosit wurden wie in der erwähnten Laktalbumindiät zugesetzt. Die restlichen Vitamine erhielten die Tiere in zwei Suspensionen. Die eine enthielt per Kubikzentimeter Wasser (in Milligrammen) Calcium Pantothenat 20, Thiaminchlorid 4,

[1] Wir sind Herrn Dr. Leo A. Pirk von Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, N. J., für vielfache Unterstützung und die Überlassung der meisten synthetischen Vitamine zu großem Dank verpflichtet.

Riboflavin 8, Pyridoxin 8, Folsäure 5, Vitamin C 50, Biotin 0,005, Vitamin B_{12} 0,01. Davon wurden den Tieren 4mal wöchentlich 2—3 Tropfen verabreicht. Die zweite Suspension enthielt per Kubikzentimeter Linolensäure (in Milligrammen) Alpha-Tocopherol 60, Vitamin D 0,5, kristallinisches γ-Carotin 5; davon erhielten die Tiere wöchentlich 3 Tropfen.

Die Wachstumsdaten sind in den Abbildungen nach der Methode von Zucker und Zucker wiedergegeben, bei der der Logarithmus des Gewichtes in Grammen gegen den reziproken Wert des Alters in Wochen aufgetragen wird. Diese Methode hat den großen Vorteil, daß das Wachstum völlig normaler Ratten dabei als Gerade erscheint, die mit der Ordinate einen für die gleiche Rattenart und das gleiche Geschlecht konstanten Winkel einschließt. Störungen des Wachstums können daher viel leichter erkannt und der Analyse zugeführt werden als bei anderen Methoden der Darstellung.

Das Schweinefett wurde durch Erhitzen auf 95° und gleichzeitiges Luftdurchblasen oxydiert; die sich bei dieser Behandlung bildenden Produkte sind nur sehr unvollständig bekannt, sie entstehen in der Hauptsache wohl durch Oxydation an den ungesättigten Gruppen. Deuel hat die bisher gewonnenen Erkenntnisse jüngstens zusammengefaßt. Wir verwendeten für diese Versuche oxydiertes Schweinefett; Pflanzenfette haben, wie oben angedeutet, vielleicht ganz andere, möglicherweise recht toxische Eigenschaften nach starker Oxydation.

Experimentelles.

In Abb. 1 sind die Resultate von Versuchen wiedergegeben, in denen den Ratten frisches oder oxydiertes Schweinefett mit verschiedenen Eiweißmengen zugeführt worden war. Das oxydierte Fett hatte eine Peroxydzahl von 266; es muß jedoch betont werden, daß in diesen Untersuchungen der Peroxydzahl keine sonderliche Bedeutung zukommt, da sie bei fortgesetzter Oxydation der Fette zunächst ansteigt und dann wieder abfällt, so daß die gleiche Peroxydzahl bei Fetten von ganz ver-

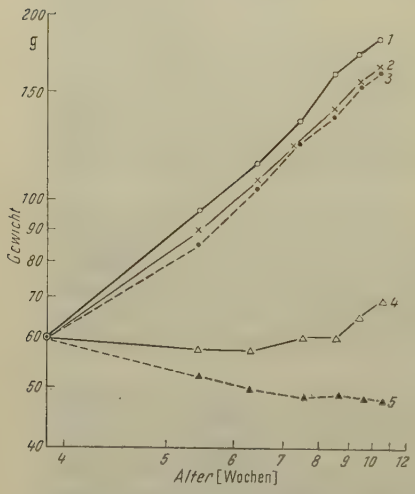


Abb. 1. Durchschnittswachstum von je 8 Rattenmännchen, deren Kost verschiedene Caseinmengen und entweder 20% frisches oder hochoxydiertes Schweinefett enthielt. Das Gewicht ist an einer logarithmischen, das Alter an einer reziproken Skala wiedergegeben. — Kurve *1* frisches Fett und 30% Casein; Kurve *2* oxydiertes Fett, 30% Casein und 2% Linolensäure; Kurve *3* oxydiertes Fett und 30% Casein; Kurve *4* frisches Fett und 5% Casein; Kurve *5* oxydiertes Fett und 5% Casein.

schiedener Oxydationsstufe und deshalb ganz anderer biologischer Aktivität gefunden werden kann. In Ermangelung eines besseren Maßstabes ist es daher angezeigt, die Zeit, die zur Oxydation verwendet wurde, als ungefähren Ausdruck des Oxydationsgrades zu benützen. Im gegebenen Falle wurde die Oxydation 200 Std lang fortgesetzt.

Nachdem die Tiere von der 4. bis zur 11. Lebenswoche mit einer 30% Casein enthaltenden Kost ernährt worden waren, zeigten die mit oxydiertem Fett versehenen eine Gewichtsherabsetzung von etwa 15% gegenüber denen mit frischem Fett. Ähnliche Versuche wurden mit gut übereinstimmenden Resultaten an 5 weiteren Gruppen durchgeführt; die Gewichtsherabsetzung lag immer zwischen 10—25%.

Wenn den Tieren bloß 5% Casein erlaubt war, war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen besonders markant. Die mit frischem Fett gehaltenen Ratten waren schließlich in der Lage, ein wenig zu wachsen, die mit oxydiertem Fett ernährten verloren dauernd an Gewicht und waren schließlich um 35% leichter als die Kontrollen. In 4 weiteren Untersuchungsreihen konnte dieses Resultat bestätigt werden, in einem Falle betrug die Gewichtsdifferenz mehr als 50%.

Wenn den Tieren 18% Casein in der Kost verabfolgt wurde, war der Gewichtsunterschied durchschnittlich 25%, während er bei der Zufuhr von 74% Casein fast verschwand. Die Zufuhr von oxydiertem Fett führt also zu einer Gewichtsherabsetzung, die durch steigende Caseingaben beinahe zum Verschwinden gebracht werden kann.

Man hatte zunächst zu erwägen, ob die beobachteten Gewichtsunterschiede nicht durch Verminderung der Nahrungsaufnahme bedingt waren. Wir bestimmten deshalb in den meisten Fällen die tägliche Nahrungsaufnahme der untersuchten Tiere. Obzwar die individuellen Fluktationen mitunter beträchtlich waren, zeigte sich zwischen den Gruppen mit gleichem Caseingehalt in der Diät kein Unterschied, wenn die durchschnittliche tägliche Nahrungsaufnahme aller Tiere für die ganze Untersuchungszeit berechnet wurde. Nur bei den mit 5% Casein versehenen Tieren war die Nahrungsaufnahme der mit oxydiertem Fett gefütterten Ratten beträchtlich vermindert. Die Gewichtsunterschiede konnten jedoch auch mit 5% Casein, wenngleich in etwas verringertem Maße, beobachtet werden, wenn den Tieren in täglicher Parallelfütterung („paired feeding") die gleiche Nahrungsmenge zugeführt wurde. Die Gewichtsdifferenz kann also nicht durch mangelnden Appetit der an oxydiertem Fett gehaltenen Gruppen erklärt werden. Warum die an 5% Casein und oxydiertem Fett gehaltenen Tiere weniger fraßen als die Kontrollen, ist nicht ganz sicher. Andere, hier nicht angeführten Untersuchungen, legten die Erklärung nahe, daß das oxydierte Fett die Eiweißausnützung besonders im Eiweißmangel herabsetzt, wodurch es zu einer — für diesen Zustand wohl bekannten — Erniedrigung der Nahrungsaufnahme kommt.

Wir hatten ferner zu überlegen, ob oxydiertes Fett schlechter resorbiert wird als frisches, wodurch es trotz Aufnahme der gleichen Quantität zu einer Verringerung der verwertbaren Nahrungsmenge kommen könnte. Wir haben deshalb die Fettresorption nach Hoagland u. Snider untersucht. Dabei wird der Fettgehalt des über eine bekannte Periode

gesammelten Stuhles in üblicher Weise nach Verseifung und Ätherextraktion bestimmt und von der in der Nahrung zugeführten, bekannten Fettmenge abgezogen. Mit frischen Fetten findet man, daß zumindest 95% resorbiert werden. Wir erhielten auch mit oxydierten Fetten ganz ähnliche Werte, so daß man versucht ist anzunehmen, daß unvollständige Fettresorption nicht die Ursache der Gewichtsdifferenz ist. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß ein Teil des Fettes durch die Oxydation in Verbindungen übergeführt wurde, welche der Bestimmung durch die oben genannte Methode entgehen. Ea wäre danach nicht ganz ausgeschlossen, daß die Tiere einen Teil des genossenen Fettes im Stuhle verloren. Es ist jedoch ganz unwahrscheinlich, daß die Gewichtsdifferenz auch nur annähernd derartig zu erklären ist; man muß vielmehr folgern, daß unvollständige Fettresorption für den Effekt höchstens in geringem Maße verantwortlich sein könnte.

Es bestand ferner die Möglichkeit, daß der Einfluß der oxydierten Fette auf Zerstörung von ungesättigten, essentiellen Fettsäuren oder von im normalen Fett vorhandenen, unbekannten Vitaminen beruht. In der Abb. 1 ist die Wachstumskurve von Ratten gezeigt, zu deren Kost 2% Linolensäure hinzugefügt worden war. Man sieht, daß sich ihr Wachstum von dem der ohne zusätzliche Linolensäure aufgezogenen Tiere nicht unterscheidet, woraus sich ergibt, daß der Mangel an ungesättigten Fettsäuren für den Gewichtsunterschied nicht verantwortlich ist.

Um der Frage der Zerstörung bisher unbekannter Faktoren irgendwie näherzukommen, wurden Versuche mit fettlosen, durch Linolensäure vervollständigten Kostarten durchgeführt. Mit 30% Casein in der Diät waren die Gewichtskurven der fettfrei ernährten und der mit 20% frischem Fett versehenen Tiere meistens recht ähnlich. Obzwar solche Versuche die Möglichkeit keineswegs ausschließen, daß Fette nur unter ganz bestimmten Bedingungen bemerkbare, bisher unbekannte Vitamine enthalten, machen diese Resultate es doch recht unwahrscheinlich, daß die Gewichtsreduktion durch die Zerstörung von unbekannten Wachstumsfaktoren bedingt war.

Wir kamen daher zu der Annahme, daß oxydierte Fette Stoffe enthalten, deren Eingreifen in den intermediären Stoffwechsel ein maximales Wachstum verhindert. Diese Annahme war auch dadurch unterstützt, daß die Gewichtsdifferenz im großen und ganzen von dem Oxydationsgrade der Fette abhing. Nach etwa 10—20stündigem Erhitzen und Lufteinblasung konnte noch kaum eine Gewichtsdifferenz beobachtet werden; die bekannten fettlöslichen Faktoren waren dabei aber schon vollständig zerstört.

Ein gewisser Hinweis auf die Natur der aktiven Substanzen ergab sich aus der vorher erwähnten Beobachtung, daß die Gewichtsdifferenz durch höhere Eiweißmengen erniedrigt werden konnte. Dies schien in

Einklang mit den Untersuchungen von Györgi u. Mitarb., von Barnes und von Kennely u. Quackenbush zu stehen, die fanden, daß manche Folgen von oxydierten Fetten durch biologische „Antioxydantien" verhindert werden können. Solche Substanzen kommen z. B. in Hefe in beträchtlicher Menge vor. Man ist wohl berechtigt anzunehmen, daß der beobachtete Caseineffekt ähnlicher Natur ist, da Eiweiß unter Umständen ein starkes Reduktionsmittel sein kann. Wenn dem so wäre, müßte man annehmen, daß ein weniger gereinigtes Eiweiß als das vielfach mit Alkohol extrahierte, von uns verwendete Casein die Wirkung von oxydiertem Fett noch stärker herabsetzen sollte. Diese Annahme wurde durch Versuche unterstützt (Abb. 2), in denen ein recht rohes Fischmehl als Eiweißquelle diente. Obwohl das betreffende oxydierte Fett in der Gegenwart von 30% Casein eine beträchtliche Wachstumsherabsetzung bewirkte, blieb diese nahezu aus, wenn der Kost selbst nur 20% Fischmehl zugesetzt worden war. Die Folgerung dürfte daher berechtigt sein, daß die in den untersuchten Fetten vorhandenen, aktiven Substanzen Oxydationsprodukte sind, die durch manche natürlich vorkommende Bestandteile der Kost reduziert und dadurch inaktiviert werden können. Eine normale, gute Kost besitzt also die Fähigkeit, oxydiertes Schweinefett, zumindestens teilweise, zu entgiften.

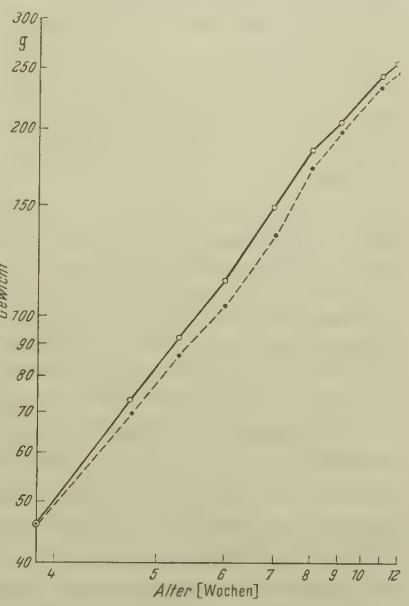


Abb. 2. Durchschnittswachstum von je 8 Rattenmännchen. — Kurve *1* 20% Fischmehl und 20% frisches Schweinefett; Kurve *2* 20% Fischmehl und 20% oxydiertes Schweinefett.

Wir bemühten uns in anderen Versuchen ausfindig zu machen, ob oxydierte Fette nicht bloß Wachstumsherabsetzung, sondern auch andere Störungen bewirken. Wir verwendeten eine 20% oxydiertes Fett und 30% Casein enthaltende Kost zur Aufzucht von 5 unmittelbar einander folgenden Rattengenerationen und beobachteten keine Fruchtbarkeitseinschränkung der Männchen und Weibchen. Die Zahl der beobachteten Schwangerschaften und Würfe war normal (vgl. Kaunitz u. Slanetz, 2), nur das Gewicht der Jungen war beträchtlich herabgesetzt.

Histologische Untersuchungen nahezu aller Organe wurden seinerzeit begonnen (Stoerk, Kaunitz u. Slanetz) und seither in weiterer Zu-

sammenarbeit mit H. STOERK und C. A. SLANETZ fortgesetzt. Selbst nach monatelanger Fütterung von hochoxydiertem Fett konnten histologische Veränderungen nirgends festgestellt werden. Die durch hochoxydiertes Schweinefett bedingten Veränderungen sind also milde, wenn die Kost alle bekannten Nahrungsbestandteile in reichlicher Menge enthält. Ob es möglich sein wird, die die Wachstumsverzögerung bedingenden, leicht reduzierbaren Oxydationsprodukte zu isolieren und ob diese Produkte vielleicht unerwünschtes Wachstum unterdrücken können, ist eine Frage, der vielleicht einige Bedeutung zukommt.

Wenn man der Nahrung essentielle Bestandteile entzieht, wird die Wirkung von oxydierten Fetten beträchtlich verstärkt. Wir haben dies oben für den Eiweißmangel gezeigt und haben darauf hingewiesen (KAUNITZ, JOHNSON u. SLANETZ), daß die durch Riboflavinmangel bedingte Erkrankung in der Gegenwart von oxydierten Fetten viel stärker auftritt.

Gegen unsere früheren, den Riboflavinmangel behandelnden Untersuchungen konnte eingewendet werden, daß das in den Diäten verwendete Casein immerhin noch etwa 1 γ Riboflavin per Gramm enthielt, daß also Ratten an einer 30% Casein und frisches Fett enthaltenden Kost im Tage ungefähr 3 γ Riboflavin zugeführt erhielten, was vielleicht 20% der für Ratten nötigen Riboflavinzufuhr ist[1]. Der Zusatz von oxydiertem Fett zur Kost hätte diese im Casein vorhandene Riboflavins vielleicht zerstören können, so daß der beobachtete Effekt möglicherweise durch Änderungen der Riboflavinzufuhr zu erklären wäre.

Zur Begegnung dieses Einwandes haben wir das Casein mittels eines anderen Ortes genauer zu schildernden Prozedur dadurch weiter gereinigt, daß wir es mit einem hochoxydiertem Fett vermengten und längere Zeit stehen ließen; dann wurde das Fett durch Extraktion mit Aceton und Petroläther beseitigt und das Casein mit Säure gewaschen. Von diesem Produkt konnte behauptet werden, daß es kein Riboflavin enthielt, welches durch oxydiertes Fett hätte zerstört werden können. Ernährungsversuche mit kompletten Kostformen bewiesen, daß diese Behandlung den Wert des Caseins als Eiweißquelle nicht geschädigt hatte.

In Abb. 3 sind die Resultate von Wachstumsuntersuchungen wiedergegeben, in denen das vorbehandelte Casein zur Fütterung von Ratten verwendet worden war, die entweder komplette oder riboflavinmangelnde Diäten erhalten hatten. Die 3 zunächst gleichmäßig wachsenden Gruppen wurden bis zum 38. Lebenstage an der oben erwähnten Lactalbuminkost belassen und dann auf die 18% Casein enthaltenden Diäten gesetzt. Der Riboflavinmangel führte mit frischem und oxydiertem Fett zu einer

[1] Wir können hier auf eine Erörterung der optimalen Riboflavinzufuhr nicht eingehen; sie schwankt unter verschiedenen Bedingungen beträchtlich, da sie von der im Rattendarm gebildeten Riboflavinmenge und vielen anderen Faktoren beeinflußt wird.

starken Wachstumseinschränkung. Die mit frischem Fett gehaltenen Tiere waren aber in der Lage, ihr Wachstum, wenn auch sehr langsam, fortzusetzen, während die mit oxydiertem Fett versehenen nahezu unmittelbar zu wachsen aufhörten und schließlich sogar Gewicht verloren. Die am Ende des Versuches vorhandene Gewichtsdifferenz zwischen den beiden riboflavinarm ernährten Gruppen war aber viel stärker ausgeprägt als wir es mit kompletten Diäten beobachtet hatten. Da Wiederholungen und Variationen dieser Versuche zu ganz ähnlichen Resultaten führten, kann wiederum behauptet werden, daß die Zufuhr von oxydiertem Fett das Zustandekommen der Riboflavinmangelkrankheit beträchtlich verstärkt. Ähnliches ist wahrscheinlich auch bei Thiaminmangel der Fall.

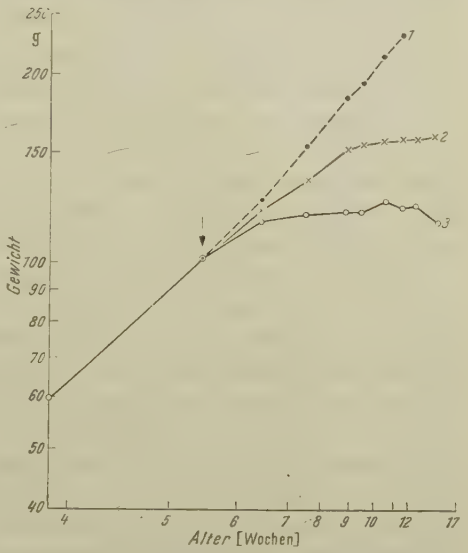


Abb. 3. Durchschnittswachstum von je 8 Rattenmännchen. Der Pfeil zeigt an, wann die experimentellen Diäten verabreicht wurden. — Kurve *1* 18% Casein und 20% frisches Schweinefett plus Riboflavin; Kurve *2* 18% Casein und 20% frisches Schweinefett minus Riboflavin; Kurve *3* 18% Casein und 20% oxydiertes Schweinefett minus Riboflavin.

Wir hatten zunächst gedacht, daß das oxydierte Fett im Rattencoecum gebildetes Riboflavin zerstört und daß dadurch der Effekt erklärt werden könnte. Mikrobiologische Untersuchungen des Coecuminhaltes schienen zunächst diese Annahme zu stützen; die schließlich beobachteten Schwankungen waren aber so groß, daß wir eine solche Erklärung verwerfen mußten.

Man ist daher versucht als zeitweilige Arbeitshypothese anzunehmen, daß die in oxydierten Fetten vorhandenen aktiven Substanzen auf intermediäre, enzymatische Vorgänge einwirken. Vielleicht verlegen die Oxydationsprodukte gerade bei Mangelzuständen manche jener „enzymatischen Nebengeleise", die das Tier wegen der durch die Mangelkrankheit erzeugten Störung der Hauptgeleise sonst wählen würde.

Obwohl wir, wie einleitend ausgeführt, der Meinung sind, daß die an hochoxydierten Fetten gewonnenen Ergebnisse für die menschliche Ernährungslehre nur sehr begrenzte Bedeutung haben, ist es nicht ganz ausgeschlossen, daß einige der angestellten Überlegungen eine gewisse Beziehung zu menschlichen Erkrankungen haben. Wir konnten aus eigener Erfahrung beobachten, daß die zahlreichen Beri-Beri-Opfer in den Philippinen eine calorisch niedrige Kost zu sich nehmen, die hauptsächlich aus geschältem Reis und in der Sonne getrocknetem und danach gebratenem Fisch besteht. Diese Kost enthält also nur geringe Mengen an

B-Faktoren, einen niedrigen Eiweißgehalt und dabei ein in seinem Oxydationsgrad recht fortgeschrittenes Fett. Alle diese Umstände können nach dem oben gesagten leicht dazu führen, daß selbst ein mäßiger B_1-Mangel zu einem schweren Krankheitsbild führt. Vielleicht erlauben es solche Überlegungen, die eine oder die andere der Schwierigkeiten zu überbrücken, denen man begegnet, wenn man Beri-Beri und manche andere menschliche Mangelerkrankungen bloß als Avitaminosen betrachtet.

Zusammenfassung.

In der Überzahl der im Schrifttum vorhandenen Berichte wird angegeben, daß die Verfütterung von hochoxydiertem Schweinefett im Tierversuch zu schweren Erkrankungen führt, die vielfach als Ausdruck von hoher Giftigkeit der zugeführten Produkte oder als Folge des Fehlens bisher unbekannter Vitamine gedeutet wurden. Im Gegensatz dazu wurde jedoch von uns beobachtet, daß die Zufuhr von hochoxydiertem Schweinefett nur milde Veränderungen erzeugt, wenn den Tieren alle bekannten Vitamine als Suspensionen seperat zugeführt werden. Man kann deshalb annehmen, daß viele der in der Literatur beobachteten Veränderungen sekundäre Mangelerkrankungen waren, die im Gefolge der raschen Zerstörung von Vitaminen durch die der Nahrung zugesetzten oxydierten Fette zustande kamen.

Die einzige konstante Veränderung durch oxydiertes Fett, die wir bisher an komplett ernährten Ratten beobachten konnten, war eine Gewichtsverminderung, die weder durch Mangel an ungesättigten Fettsäuren, noch durch verminderte Nahrungsaufnahme und höchstwahrscheinlich auch nicht durch gestörte Fettresorption erklärt werden konnte. Das Ausmaß der Gewichtsherabsetzung lief dem Oxydationsgrade der Fette ungefähr parallel. Versuche mit fettfreien Kostformen machten es unwahrscheinlich, daß die Gewichtsherabsetzung durch das Fehlen von bisher unbekannten Wachstumsfaktoren bedingt war.

Zunehmender Eiweißgehalt der Kost verminderte die Gewichtsherabsetzung. Dies sowie Hinweise aus der Literatur erlaubten den Schluß, daß Eiweiß die aktiven Verbindungen des oxydierten Fettes reduzieren und dadurch inaktivieren kann. Der Effekt dürfte also durch relativ leicht reduzierbare Produkte bedingt sein, die während der Oxydation gebildet werden. Jede normale Kost sollte durch ihren Gehalt an „Antioxydantien“ befähigt sein, die durch Oxydation in Fetten gebildeten, biologisch aktiven Substanzen weitgehend zu entgiften.

Die Wirkung von hochoxydierten Fetten war viel stärker ausgesprochen, wenn sie einer Kost zugesetzt wurden, der es an Eiweiß oder Riboflavin ermangelte. Unter diesen Umständen war das durch diese Mangelkrankheiten hervorgerufene Krankheitsbild viel stärker ausgeprägt als mit frischem Fett. Es ist möglich, daß weitere Einsichten in die biologische Wirkung von oxydierten Fetten gerade im Zusammenhang mit Studien über Mangelkrankheiten erhalten werden könnten.

Literatur.

Barnes, R. H.: Biolog. Antioxydants, Transact. 1st Conference. p. 49 (1946). — Barnes, R. H., M. Clausen, I. I. Russoff, H. F. Hanson, M. E. Swenseid et G. O. Burr: Arch. sci. physiol., Paris **2**, 313 (1948). — Deuel, H. J. jr.: The Lipids, Interscience Publishers. New York 1951. — György, P., R. Tomarelli, R. P. Ostergard and J. B. Brown: J. of Exper. Med. **76**, 413 (1942). — Hoagland, R., and G. G. Snider: U.S. Dept. of Agriculture Bulletin 821 (1942). — Kaunitz, H.: Wien. med. Wschr. **102**, 356 (1952). — Kaunitz, H., R. E. Johnson and C. A. Slanetz: J. Nutrit. **46**, 151 (1952). — Kaunitz, H., and C. A. Slanetz: (1) Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **75**, 322 (1950); (2) Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **66**, 334 (1947). — Kennelly, B., and Quackenbush: Biolog. Antioxydants, Transact. 1st Conference, p. 56 (1946). — Quackenbush, F. W.: Oil and Soap **22**, 336 (1945). — Riemenschneider, R. W., and W. C. Ault: Food Industr. **16**, 892, 936 (1944). — Stoerk, H. C., H. Kaunitz and C. A. Slanetz: Arch. of Path. **53**, 15 (1952). — Zucker, T. F., and L. M. Zucker: J. Gen. Physiol. **25**, 445 (1942).

Dr. Hans Kaunitz, Columbia University, Department of Pathology, 630 West 168th Street, New York 32, N.Y.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 26—39 (1953).

Department of Pharmacology, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley 10, New Jersey.

Peripheral effects of the optical antipodes of 3-Hydroxy-N-Methyl-Morphinan and some of their derivatives.

By

Lowell O. Randall, J. Kruger, C. Conroy, B. Kappell and Wilbur M. Benson.

With 4 figures in the text.

(Eingegangen am 23. Februar 1953.)

The central and peripheral effects of racemorphan* are very similar to those of morphine (Fromherz[11], Randall and Lehmann[18]). The analgesic and respiratory depressant effects are characteristic properties of levorphan while dextrorphan (*d*-isomer) has very little, if any, such effects at sublethal doses (Fromherz[11], Randall and Lehmann[18], Benson et al.[2]). Moderate analgesic doses of racemorphan given intravenously produce depressor effects which in dogs and cats are very prolonged (Randall and Lehmann[18]). This depressor effect is similar to that produced by morphine (Schmidt and Livingston[20]). Tolerance to the depressor effect of racemorphan like that of morphine develops very quickly so that a second dose usually has much less effect on blood pressure (Randall and Lehmann[18]). It was of interest to determine whether dextrorphan, the *d*-isomer which is not analgesic, has similar depressor properties as levorphan, the *l*-isomer. Dextromethorphan and levomethorphan were also studied because these have been found to have antitussive action (Fromherz and Pellmont[13], Benson et al.[3]).

The *d*-isomer of 3-hydroxy-N-allylmorphinan has no analgesic effects but the *l*-isomer has weak analgesic effects and is a powerful antidote to the respiratory depression produced by racemorphan, morphine and other analgesics; the *l*-isomer may be somewhat less active as an anti-analgesic agent and nearly inactive as an antagonist to the lethal effects (Fromherz and Pellmont[12]; Benson et al.[4]). The blood pressure effects of these derivatives have now been studied in comparison with levorphan.

---

* racemorpahn = *dl*-3-hydroxy-N-methylmorphinan
levorphan = *l*-3-hydroxy-N-methylmorphinan
dextrorphan = *d*-3-hydroxy-N-methylmorphinan
dextromethorphan = *d*-3-methoxy-N-methylmorphinan
levomethorphan = *l*-3-methoxy-N-methylmorphinan

Methods.

Blood pressure was measured with a mercury manometer from the carotid artery of dogs and cats anesthetized with Dial-urethane. Femoral blood flow was measured with a SHIPLEY and WILSON[23] rotameter recording with a Sanborn Twin-Viso apparatus. The general procedure was similar to that described by ROBERTS et al.[19]. Bronchial tone was measured by the method of KONZETT and ROESSLER[15] using cats in which the spinal cord was severed at the level of the foramen magnum under ether anesthesia. Ganglionic effects were measured in cats anesthetized with Dial-urethane. The nictitating membrane was attached to a light muscle lever. The superior cervical nerve was stimulated with an Electrodyne stimulator at the rate of four per second. Analgesic effects were measured in rats by the thermal irradiation technique of ERCOLI and LEWIS[8].

Cholinesterase inhibition was measured by the manometric method of AMMON[1]. Purified cholinesterase from the electric eel was kindly supplied by Dr. D. NACHMANSOHN. Acetylcholine bromide was used in a concentration of 0.03 M. The whole brain of rats was homogenized in RINGER-bicarbonate solution with a glass homogenizer. 0.2 cc of a 1:5 dilution (40 mg.) of brei was used in each WARBURG flask in a volume of 3.0 cc. The inhibitors were incubated with the brei for thirty minutes at 24° C. in an atmosphere of 95 per cent nitrogen—5 per cent carbon dioxide. The reaction was measured at five-minute intervals and the microliters of Co_2 evolved per 100 mg. of tissue per fifteen minutes was calculated. The per cent inhibitions were calculated from this value.

Respiration of the rat brain cortex slices was measured by the usual WARBURG technique. Slices were made with a template and suspended in 3.0 cc of KREBS RINGER-phosphate solution. Respiration was measured at 38° C. in an oxygen atmosphere during a control period of thirty minutes and then the compound was added from the side arm. The per cent changes were calculated from the average QO_2 values of the thirty-minute control period.

Blood Pressure Effects.

SCHMIDT and LIVINGSTON[20] believed that the prolonged depressor effects of morphine and its derivatives in cats and dogs were caused by a direct action upon the blood vessels and the heart. They found, however, that rabbits, rats and guinea pigs were resistant to the blood pressure effects of morphine. However, the prolonged depressor effect of morphine in cats was believed by EVANS et al.[9] to be a combined effect of depression of the vasomotor center and release of histamine peripherally. The depressor effect was much reduced by sectioning the spinal cord in cats and was completely abolished when an antihistamine agent was given to the spinal cat. In the cat, the vagal center was not involved since vagotomy or atropine did not influence the response. However, in the rat, vagotomy abolished the depressor effect so that the response appeared to be mediated through the vagus.

The blood pressure effects of levorphan, dextrorphan, and some of their homologs in the dog are summarized in Table 1. In the anesthetized dog, the first dose of levorphan (Ro 1—5431/7) causes a profound long-lasting depressor effect. This effect is illustrated in Figure 1. A second dose already shows acute tolerance (tachyphylaxis); only a short depressor action is noted.

Crossed tolerance to the related depressor agents is also shown. After tolerance te levorphan has developed, dextrorphan (Ro 1—6794) shows only a slight depressor effect (Figure 1). Likewise, the prolonged

Table 1. *Dog Blood Pressure.*

	Dose mgm/kgm	Order of Dose	Response mm Hg.	Duration in Mins.
Ro 1—5431/7	0.5	1st dose	—40	120
levorphan tartrate	0.5	2nd dose	—26	2
l-3-hydroxy-N-methyl-	1	1st dose	—45	180
morphinan tartrate	1	2nd dose	—30	3
	1	After Ro 1—6794	—10	3
	1	After Ro 1—7700	—56	1
	1	After Ro 1—5470/5	—20	1
	1	After Ro 1—7059	—70	120
Ro 1—6794	1	1st dose	—85	60
dextrorphan tartrate	1	2nd dose	—75	30
d-3-hydroxy-N-methyl-	1	3rd dose	—40	15
morphinan tartrate	1	After Ro 1—5431/7	—20	1
Ro 1—7788	1	1st dose	—80	40
levomethorphan	1	2nd dose	—18	5
hydrobromide	1	After Ro 1—5431/7	+ 8	5
l-3-methoxy-N-methyl-	1	After Ro 1—6794	—20	1
morphinan hydrobromide				
Ro 1—5470/5	1	1st dose	—120	60
dextromethorphan	1	2nd dose	—85	120
hydrobromide	1	3rd dose	—20	1
d-3-methoxy-N-methyl-	1	After Ro 1—5431/7	—15	1
morphinan hydrobromide		After Ro 1—7788	—25	1
Ro 1—7700	1	1st dose	—35	1
l-3-hydroxy-N-	1	2nd dose	—34	1
allylmorphinan	1	After Ro 1—7059	—10	1
tartrate	1	After Ro 1—5431/7	—40	1
	1	After Ro 1—5470/5	—35	1
Ro 1—7059	1	1st dose	—40	1
d-3-hydroxy-N-	1	2nd dose	—50	1
allylmorphinan	1	After Ro 1—7700	—30	1
hydrobromide	1	After Ro 1—5470/5	—35	1

depressor effects of dextromethorphan and levomethorphan are inhibited by levorphan. Similar prolonged depressor effects and the development of tolerance and crossed tolerance were observed in cats anesthetized with Dial-urethane.

The depressor effects produced by stimulation of the vagus nerve or by acetylcholine are not blocked by levorphan. The carotid occlusion reflex is partially inhibited during the depressor phase. This usually returns to normal together with the blood pressure. The epinephrine pressor response suggests the influence of strong vagal stimulation. The heart rate of the dog is accelerated during the first few minutes but is slowed down during the long recovery phase. The rate was increased by 36 beats per minute during the first minute but decreased by 74 beats

per minute after forty minutes. Previous administration of atropine, phenindamine (Thephorin^{R}), and hexamethonium and vagotomy did not prevent the depressor effect of levorphan (Figure 1). Therefore, the depressor effect cannot be entirely accounted for by the stimulation of the vagus center, depression of the vasomotor center or by histamine release but a peripheral action is suspected.

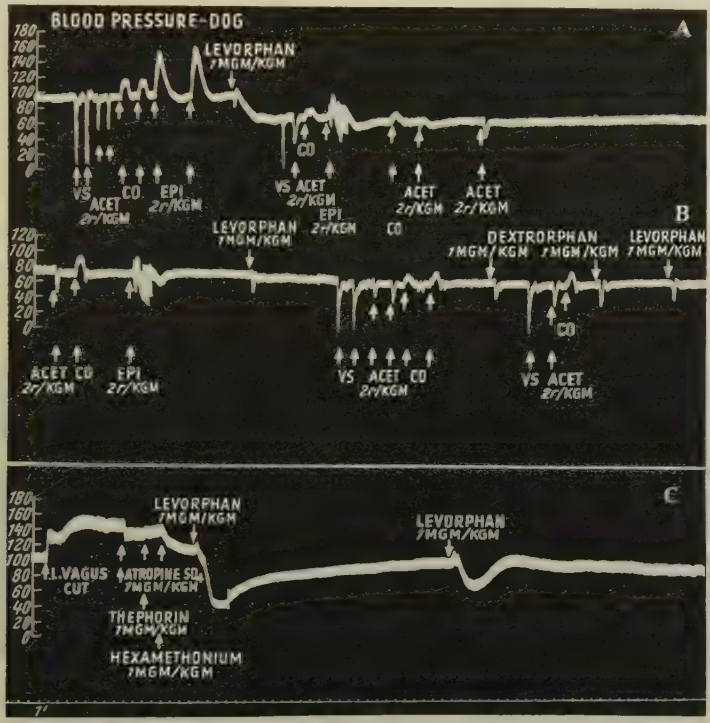


Figure 1. Blood pressure of a dog anesthetized with pentobarbital. Levorphan, 1 mgm./kgm., I. V Dextrorphan, 1 mgm./kgm., I. V. — *V.S.* vagus stimulation for ten seconds; *C.O.* carotid occlusion for one minute; *Epi.* epinephrine, 2 microgram/kgm.; *Acet.* acetylcholine, 2 microgram/kgm. *A* and *B* are continuous records from one dog. *C* is a record from a different dog. Thephorin, 1 mgm./kgm. Atropine, 1 mgm./kgm. Hexamethonium, 1 mgm./kgm. Both vagi were cut. Time is in minutes.

Dextrorphan shows a prolonged depressor effect similar to that produced by levorphan. Acute tolerance develops more slowly since the third dose still shows considerable depressor effects. Crossed tolerance to levorphan is present following the development of tolerance to dextrorphan. Tolerance to levomethorphan and dextromethorphan is also present. Dextrorphan has little effect on the response of the blood pressure to vagus stimulation, acetylcholine or epinephrine, but the carotid occlusion reflex is inhibited during the depressor phase. Dextror-

phan also causes an initial acceleration of heart rates followed by slowing during the recovery phase. The rate increased 39 beats per minute after one minute but decreased 15 beats per minute after fifteen minutes.

Dextromethorphan (Figure 2) shows prolonged depressor effects similar to those of dextrorphan. A second dose still shows strong depressor properties but tolerance develops with the third dose. Crossed tolerance to levorphan, dextrorphan and levomethorphan is caused by dextromethorphan. This compound also shows very little effect on the

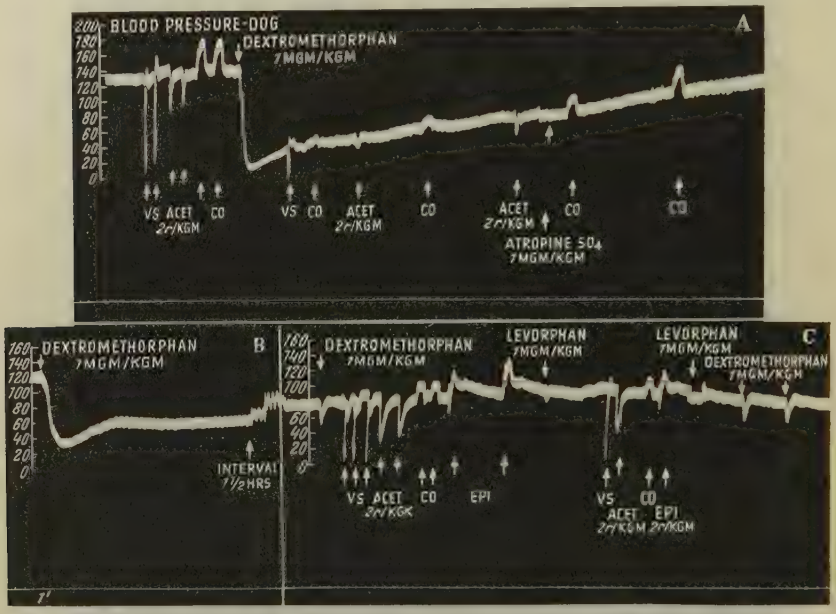


Figure 2. Blood pressure in a dog anesthetized with pentobarbital. Dextromethorphan, 1 mgm./kgm., I. V. Levorphan, 1 mgm./kgm. — *V.S.* vagus stimulation; *C.O.* carotid occlusion for one minute; *Acet.* acetylcholine, 2 microgram/kgm.; *Epi.* epinephrine, 2 microgram/kgm. — *A* and *B* are continuous records in a single dog. *C* is a record from a different dog which had received two doses of dextromethorphan.

blood pressure responses to vagus stimulation, acetylcholine or epinephrine but again depresses the response to carotid occlusion. The heart rate was accelerated by 20 beats per minute after one minute and was slowed by 23 beats per minute after ten minutes.

Ro 1—7700, the antagonist to levorphan, does not show the profound depressor effects of levorphan (Figure 3). Usually a dose of 1 mgm./kgm. exerts a depressor effect of 30—40 mm Hg. for about one minute. This short-lasting depressor effect persists with repeated doses. However, the prolonged depressor effects of levorphan do not occur following a dose of Ro 1—7700. Apparently, this compound blocks the receptors respon-

sible for the prolonged depressor effects of levorphan as well as the analgesic and respiratory depressant effects.

Ro 1—7059, the dextro analog of Ro 1—7700, is also a short-acting depressor agent but it failed to prevent the prolonged depressor effects of levorphan. Therefore, it is not an antagonist to either the blood pressure effects or the analgesic and respiratory depressant effects of levorphan.

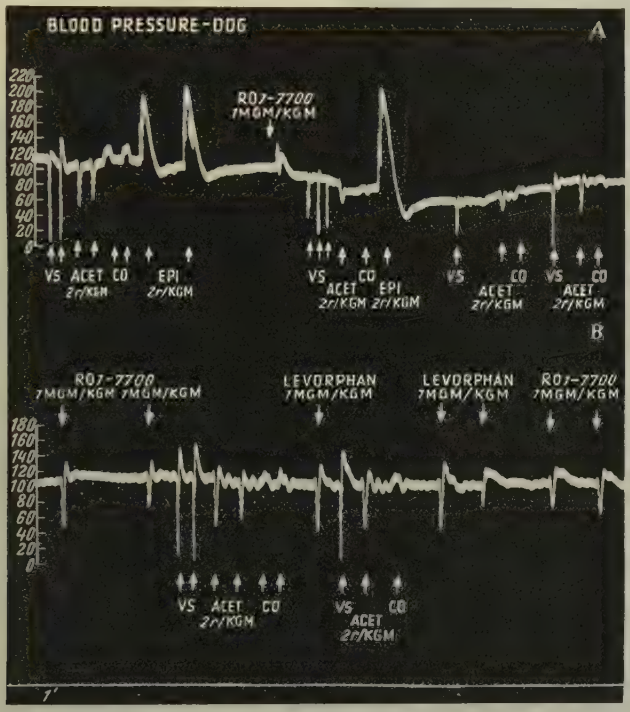


Figure 3. Blood pressure in a dog anesthetized with pentobarbital. Ro 1—7700, 1 mgm./kgm., I. V. Levorphan, 1 mgm./kgm., I. V. — *V.S.* vagus stimulation; *C.O.* carotid occlusion for one minute; *Acet.* acetylcholine, 2 microgram/kgm.; *Epi.* epinephrine, 2 microgram/kgm.

In the spinal cat (Figure 4), levorphan shows a pressor effect rather than the prolonged depressor action observed in the normal anesthetized cat. The failure of the compound to produce the prolonged depressor effect in the cat in which the vasomotor tone has been abolished by section of the spinal cord indicates that part of the depressor action is due to central depression of the vasomotor center in this species. The pressor action observed is probably related to vasoconstriction in the visceral areas or to release of epinephrine from the adrenals similar to the effects of morphine (Evans et al.[9]). Similar pressor effects in the

spinal animal are noted with dextrorphan, levomethorphan and Ro 1—7700. However, dextromethorphan and Ro 1—7059 show a short-lasting depressor effect.

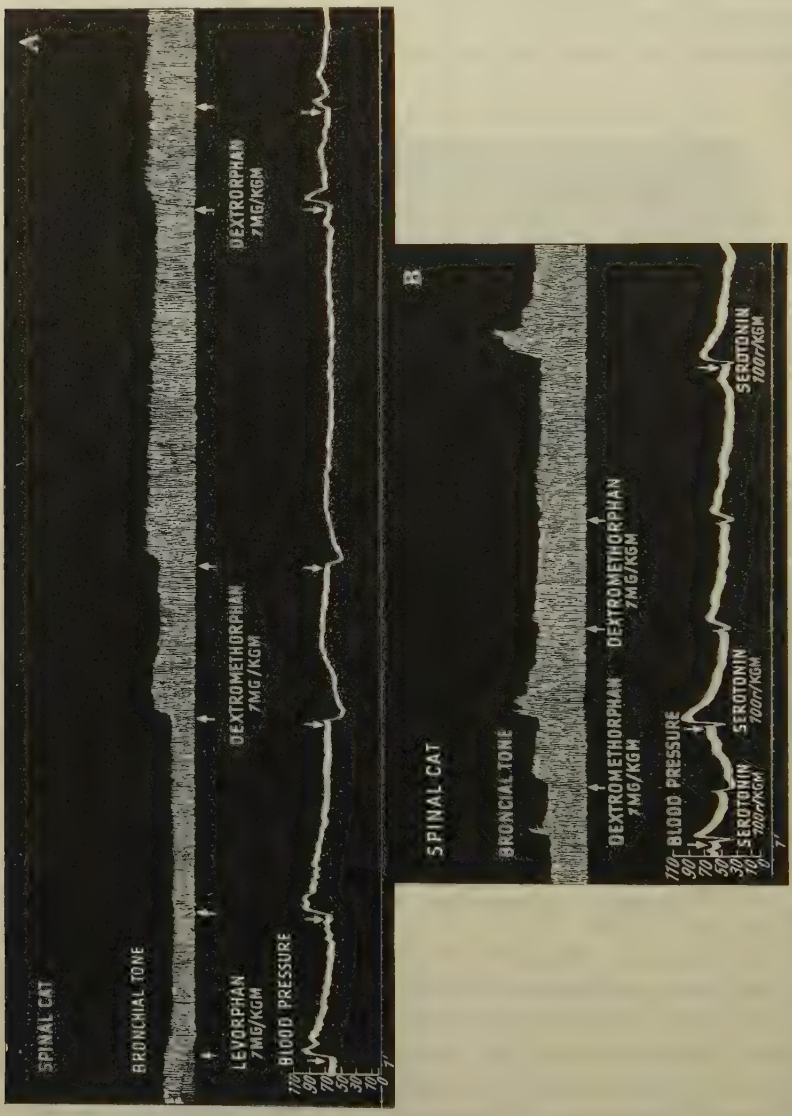


Figure 4. Blood pressure and bronchial tone in a spinal cat. Records *A* and *B* are from different cats. Levorphan, 1 mgm./kgm., I. V. Dextromethorphan, 1 mgm./kgm. Dextrorphan, 1 mgm./kgm. Serotonin, 0.1 mgm./kgm.

Blood flow in the femoral artery together with the blood pressure in the carotid and femoral artery were measured in dogs anesthetized with pentobarbital. The protocols in Table 2 show the results in the

normally innervated leg and the denervated leg. Methacholine (β-Methyl-Acetylcholine bromide) increased blood flow, epinephrine decreased the flow and serotonin (5-hydroxytryptamine creatinine sulfate) initially increased and then decreased flow rates when injected intra-arterially. The doses used had very little effect on the blood pressure after traversing the artery.

Levorphan at 0.5 mgm./kgm. intra-arterially increased the blood flow markedly. The increase in blood flow preceded by a few seconds the

Table 2. *Blood Pressure and Femoral Blood Flow in Dogs.*

Drug	Dose mgm/kgm I.A.	Femoral Blood Flow		Carotid Pressure	
		Change cc/Min.	Duration Mins.	Change mm Hg.	Duration Mins.
Dog with Innervated Leg					
Methacholine	.001	+29	2		
Serotonin	.050	+15	2		
Levorphan	0.5	+30	35+	—68	35+
Methacholine	.001	+10	2		
Serotonin	.050	+ 2	1		
Levorphan	0.5	+34	30+	+ 5	1
Levorphan	0.5	+20	30+	— 5	1
Dextrorphan	0.5	+39	15+	—40	10
Dog with Denervated Leg					
Serotonin	.05	+ 7	1		
Methacholine	.001	+37	5		
Epinephrine	.001	—40	2		
Levorphan	0.5	+52	60	—64	60+
Serotonin	.05	+21	1		
Methacholine	.001	+41	2		
Epinephrine	.001	—25	1		
Levorphan	0.5	+67	40	—55	10
Serotonin	.05	+26	3		
Methacholine	.001	+23	2		
Epinephrine	.001	—21	3		
Dextrorphan	0.5	+67	>30	—30	10
Dextromethorphan	0.5	+35	>10	0	0

fall in carotid blood pressure, but paralleled the fall in pressure in the perfused leg. This indicates a direct action of the compound on the blood vessels rather than a centrally mediated action. The blood flow rates usually show a decline from the high level during the second minute followed quickly by a prolonged increase. The duration of action on blood flow with the first dose parallels the duration of the depressor action on carotid and femoral pressures. The second and third doses of levorphan still produced a prolonged increase in femoral flow rates at

the same time that the blood depressor effects were of short duration. Dextrorphan given after levorphan also showed prolonged effects on flow rates but only short depressor effects.

Very similar effects were observed in the denervated leg. Levorphan caused a prolonged increase in blood flow which paralleled the depressor effect with the first dose. Subsequent doses showed prolonged increases in blood flow together with short depressor effects. Dextrorphan and dextromethorphan given after levorphan had only minor effects on carotid blood pressure but produced increases in femoral blood flow. The blood flow rates following large intra-arterial doses are not exactly reflected in the blood pressure effects. Tolerance appears to develop much more slowly to the vasodilator action than to the general blood pressure effects.

Measurements of bronchial tone show that levorphan relaxes the bronchial muscle whereas dextrorphan and dextromethorphan cause bronchoconstriction (Figure 4). Serotonin* was used as a standard bronchoconstrictor agent (Freyburger et al.[10]). Dextromethorphan potentiates the action of serotonin on the bronchial muscle. No effect on bronchial tone was noted after levomethorphan, Ro 1—7700 or Ro 1—7059.

The action on sympathetic ganglia was further tested by measuring the effects on the response of the nictitating membrane of cats to stimulation of the superior cervical nerve. Doses of 1 mgm./kgm. I. V. of the levorphan or of the other five derivatives studied had no inhibitory effect on ganglionic transmission.

Cholinesterase Inhibition.

Considerations that the cholinergic effects of morphine may be related to the anticholinesterase activity (Bernheim and Bernheim[5]) have prompted such studies on other analgesics. It was believed, however, that the anticholinesterase activities of methadone (Eadie et al.[6]) and of alphaprodine (Nisentil^{R} = *d-l*-α-1,3-dimethyl-4-phenyl-4-propionoxy piperidine hydrochloride) and derivatives (Randall and Lehmann[17]) were unrelated to the cholinergic effects. The compounds in the present paper were studied for anticholinesterase activity in order to compare this activity with the depressor properties.

The results in Table 3 show that levorphan and dextrorphan are equally active and both are stronger than morphine as anticholinesterase agents when measured on the purified eel esterase. The *d*- and *l*-isomers of 3-hydroxy-N-allylmorphinan are as potent as levorphan and dextrorphan while levomethorphan and dextromethorphan are nearly inactive. Similar results were obtained on rat brain esterase although higher concentrations of the compounds are necessary for inhibition. In the

* Serotonin creatinine sulfate was kindly supplied by Doctors Hamlin and Richards of the Abbott Laboratories.

case of the brain esterase, the *d*-isomers are only slightly less potent than the *l*-isomers. These results indicate that the anticholinesterase activity of levorphan and its isomers is not related to the blood pressure effects, analgesic effects or toxicity.

When mixtures of levorphan and *l*-3-hydroxy-N-allylmorphinan were added to the eel esterase, the degree of inhibition was additive rather than antagonistic. Concentrations of *l*-3-hydroxy-N-allylmorphinan of 0.00025 M. to 0.005 M. did not inhibit the anticholinesterase activity of levorphan in concentrations of 0.0005 to .005 M.

When levorphan was injected subcutaneously into rats in doses of 20, 50, 75 and 100 mgm./kgm., depression and catatonia were produced

Table 3. *Comparison of Anticholinesterase Activity "In Vitro" With Analgesic Potency and Toxicity.*

	Ro 1—	Anticholinesterase Activity (Conc. for 50%) Inhibition		Analgesic Potency Rat S. C.	Toxicity Rat LD 50 mgm/kgm S. C.
		Eel Esterase	Rat Brain Esterase		
levorphan tartrate. . . .	5431/7	0.0015	0.0025	8	77
dextrorphan tartrate . .	6794	0.0015	0.005	0	800
levomethorphan hydrobromide	7788	>0.02	>0.02	1	363
dextromethorphan hydrobromide	5470/5	>0.02	>0.02	0	>400
l-3-hydroxy-N-allyl-morphinan tartrate . .	7700	0.001	0.0025	1/10	—
d-3-hydroxy-N-allyl-morphinan hydrobromide	7059	0.001	0.0033	0	—
Morphine Sulfate		0.006	—	1	600

Table 4. *Rat Brain Cholinesterase "In Vivo".*

	Rat No.	Dose mgm/kgm S. C.	μ 1. CO_2/100 mg./15′
Control.	1		215,208
	2		260,268
	3		115,127
	4		222,222
	5		190
levorphan tartrate	6	20	236,238
	7	50	195,180
	8	75	215
	9	100	235,230

which were very marked at the higher doses. The rats were killed after one hour and the brain esterase was measured. The results in Table 4 show that there was no significant inhibition of the brain esterase under these conditions. The central effects of levorphan cannot be accounted for by the anticholinesterase activity.

Respiration of Brain Cortex.

The theory of Quastel[16] that narcosis is due to inhibition of carbohydrate metabolism in the brain has provoked similar studies on analgesics. Racemic methadone was shown to inhibit the oxidation of brain by Elliott et al.[7] and Greig[14]. However, Watts[26] showed that the *d*-methadone had the same depressant action on brain respiration as the *l*-isomer. Therefore, the inhibition of respiration could not account for the analgesic effect of the *l*-isomer.

Table 5. *Respiration of Rat Brain Cortex Slices in Presence of .01 M. Concentration of Compounds.*

	QO_2 in Initial Period	Per Cent of 30′ Initial Respiration					
		10′	20′	30′	40′	50′	60′
Control	8.8	105	104	100	98	97	95
Ro 1—5431/7	8.4	126	105	101	102	101	100
Ro 1—6794	7.9	115	99	97	97	97	97
Ro 1—7700	8.4	119	105	101	102	101	99
Ro 1—7059	8.6	122	100	102	101	101	102
Ro 1—5470/5	8.3	111	110	104	104	105	107

We have now studied the effects of levorphan and its derivatives on brain respiration. Table 5 shows that the concentration of 0.01 M. of five compounds had no effect on brain respiration. The lack of inhibition by these high concentrations of the compounds indicates that there is no relationship of analgesic effectiveness to brain respiration.

Discussion.

The rapid intravenous injections of 1 mgm./kgm. of levorphan, dextrorphan, levomethorphan and dextromethorphan produce profound falls of blood pressure with slow recovery in one to two hours. Acute tolerance (tachyphylaxis) to the prolonged depressor effects develops for each drug with the second or third injections. Once acute tolerance has developed to any one of these four compounds, crossed tolerance to the other three is also shown.

These acute and crossed tolerance effects are similar to those described by Schmidt and Livingston[20] for morphine, codeine, heroin and pseudomorphine. Acute and cross tolerance was also shown for other members of the morphine series by Tatum, Seevers and Collins[24]. Acute tolerance to meperidine and methadone likewise developed, but meperidine produced no cross tolerance to morphine and only partial tolerance to methadone (Shideman and Johnson[22]). Methadone

produced no tolerance to morphine or meperidine and morphine produced no tolerance to methadone and only partial tolerance to meperidine. THORP[25] found that acute tolerance developed to *l*-methadone but failed to develop to *d*-methadone.

Our experiments show that both acute and cross tolerance develop to the dextrorphan and dextromethorphan as well as levorphan and levomethorphan.

The antagonist to levorphan, *l*-3-hydroxy-N-allylmorphinan (Ro 1—7700) did not show the prolonged depressor properties of levorphan but only short depressor properties and no development of acute tolerance to this short depressor effect. However, the *l*-N-allyl compound prevented the profound depressor effects of a subsequent dose of levorphan. Although the *l*-N-allyl derivative could prevent the depressor effects of levorphan, it did not affect the depressed blood pressure which had been produced by the initial dose of levorphan. It did not antagonize a depressed blood pressure in the sense that it antagonizes respiratory depression or the analgesic effects of levorphan. The *d*-N-allyl derivative Ro 1—7059 did not produce a protracted fall of blood pressure and also failed to prevent the depression produced by a subsequent dose of levorphan.

Levorphan in the dog and cat appears to have both central effects in depressing the vasomotor center and peripheral effects in causing direct vasodilation in leg vessels and vasoconstriction in visceral areas similar to the effects of morphine. The central effect is indicated by the fact that in the spinal cat the blood pressure which is already low because of the absence of central vasomotor effects, is raised by levorphan instead of depressed. The rise in blood pressure may result from vasoconstriction in the visceral areas or epinephrine release from the adrenals. In the absence of vasomotor tone, this effect counterbalances the peripheral vasodilator action. The direct peripheral vascular effects in the dog are indicated from the failure of hexamethonium, phenindamine and atropine to block the blood pressure fall.

Direct evidence for the action of levorphan, dextrorphan and dextromethorphan was obtained by measurement of the flow rates in the femoral artery. Direct intra-arterial injections produced marked long-lasting increases in flow rates. The vasodilator effects developed more quickly and lasted longer than the general circulatory effects indicating a direct action on the perfused vessels. Tolerance to the direct vascular action appeared to develop much more slowly than to the general blood pressure effects. Crossed tolerance also appeared to be much less since dextrorphan and dextromethorphan still showed vasodilator properties following several doses of levorphan.

No evidence of effects of levorphan on the peripheral autonomic nervous system could be found. There was no ganglionic blocking action

in cats. Hexamethonium and atropine failed to block the depressor action of levorphan.

The suggestion that the central or peripheral effects of morphine and its analogs could be related to the anticholinesterase activity (Bernheim et al.[5]; Wright and Sabine[27]) has not been favored for synthetic analgesics (Randall and Lehmann[17]). The considerable inhibitory effects of levorphan, dextrorphan and the N-allyl derivatives on eel esterase and rat brain esterase together with the very weak activity of the levomethorphan and dextromethorphan indicated no obvious correlation with the analgesic effects, blood pressure effects or toxicity. The concentrations of levorphan necessary to inhibit brain cholinesterase in vitro would be lethal to the animal. Also, sublethal doses given to a rat failed to inhibit the brain cholinesterase.

Attempts to relate the analgesic effects of morphine and synthetic analgesics to brain metabolism have not been successful. Morphine has little effect on brain respiration (Seevers and Shideman[21]). Methadone and meperidine inhibit respiration and glycolysis of brain tissue but only at high concentrations (Elliott, Warrens and James[7]). Also, the *d*- and *l*-isomers of methadone and isomethadone are equally effective as inihibitors of oxidation of various substrates (Watts[26]). The present experiments likewise show no relationship of brain cortex respiration in the presence of high concentrations of levorphan and its isomers to the analgesic effects.

Summary.

Levorphan, dextrorphan, levomethorphan and dextromethorphan have prolonged depressor effects in dogs and cats similar to the effects of morphine. Tolerance to the prolonged depressor effects develops with each compound and crossed tolerance is also observed. The prolonged depressor action is believed to be a combined effect of central depression and peripheral vasodilation.

Only short depressor effects were observed with the antagonist, *l*-3-hydroxy-N-allylmorphinan, but it inhibited the depressor effects of levorphan. However, the *d*-3-hydroxy-N-allylmorphinan failed to antagonize levorphan.

No relationship could be found between the anticholinesterase activity or of the effects on brain respiration to the depressor effects, the analgesic effects or the toxicity.

References.

[1] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1933). — [2] Benson, W. M., P. L. Stefko and L. O. Randall: J. of Pharmacol. (In Press). — [3] Benson, W. M., and P. L. Stefko: J. of Pharmacol. (In Press). — [4] Benson, W. M., E. O'Gara and S. van Winkle: J. of Pharmacol. **106**, 373 (1952). — [5] Bernheim, F., and M. L. C. Bernheim: J. of Pharmacol. **57**, 427 (1936). — [6] Eadie, G. S., F. Bernheim and D. B.

Fitzgerald: J. of Pharmacol. **94**, 19 (1948). — [7] Elliott, H. W., E. A. Warrens and H. P. James: J. of Pharmacol. **91**, 98 (1947). — [8] Ercoli, N., and M. N. Lewis: J. of Pharmacol. **84**, 301 (1945). — [9] Evans, A. G. J., P. A. Nasmyth and H. C. Stewart: Brit. J. Pharmacol. **7**, 542 (1952). — [10] Freyburger, W. A., B. E. Graham, M. M. Rapport, P. H. Seay, W. M. Govier, O. F. Swoap and M. J. Van der Brook: J. of Pharmacol. **105**, 80 (1952). — [11] Fromherz, K.: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 387 (1950). — [12] Fromherz, K., and B. Pellmont: Experientia **8**, 394 (1952). — [13] Fromherz, K., and B. Pellmont: Unpublished observations. — [14] Greig, M. E.: Arch. Biochem. (New York) **17**, 129 (1948). — [15] Konzett, H., and R. Roessler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — [16] Quastel, J. H.: Physiologic. Rev. **19**, 135 (1939). — [17] Randall, L. O., and G. Lehmann: J. of Pharmacol. **93**, 314 (1948). — [18] Randall, L. O., and G. Lehmann: J. of Pharmacol. **99**, 163 (1950). — [19] Roberts, G., A. W. Richardson and H. D. Green: J. of Pharmacol. **105**, 466 (1952). — [20] Schmidt, C. F., and A. E. Livingston: J. of Pharmacol. **47**, 411, 473 (1933). — [21] Seevers, M. H., and F. E. Shideman: J. of Pharmacol. **71**, 373 (1941). — [22] Shideman, F. E., and H. T. Johnson: J. of Pharmacol. **92**, 414 (1948). — [23] Shipley, R. E., and C. Wilson: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 724 (1951). — [24] Tatum, A. L., M. H. Seevers and K. H. Collins: J. of Pharmacol. **36**, 447 (1929). — [25] Thorp, R. H.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 98 (1949). — [26] Watts, D. T.: Arch. Biochem. (New York) **25**, 201 (1950). — [27] Wright, C. I., and J. C. Sabine: J. of Pharmacol. **78**, 375 (1943).

Dr. Lowell O. Randall, Hoffmann-La Roche Inc. (Department of Pharmacology) Roche Park, Nutley 10, New Jersey.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 40—42 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Reflektorische Atemhemmung durch p-Chlor-phenyl-aethanolamin.

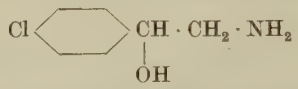
Von

W. Heubner und D. Viessmann*.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Februar 1953.)

Bei der Untersuchung einer von der Firma Riedel-de Haen hergestellten und uns übergebenen Substanz ergab sich ein Befund, der uns einer kurzen Mitteilung wert erscheint. Es handelt sich um p-Chlorphenyl-aethanolamin, also eine Base, die einem „Nor-Synephrin" entspricht, in dem das Phenol-Hydroxyl durch Halogen ersetzt ist:



Es war von vornherein zu erwarten, daß die Substanz sich auch pharmakologisch in die Reihe der Adrenalinderivate stellte, was mit einer gewissen Annäherung, zutraf. Sie wirkte (an Ratten und Meerschweinchen) in ähnlicher Weise blutdrucksteigernd, wie etwa Ephedrin, wenn auch erst in doppelter Dosis; an Ratten ging zuweilen eine Blutdrucksenkung — wie bei kurzer Vaguserregung — voraus. Am isolierten Meerschweinchendarm wurde zwar die Peristaltik vorübergehend vermehrt, jedoch die Empfänglichkeit für die Kontraktionswirkung von Acetylcholin und Bariumchlorid vermindert.

Was unser besonderes Interesse erweckte, war eine kurzdauernde hemmende Wirkung auf die Atmung, und zwar in gleicher Weise an Meerschweinchen, Ratten und Katzen. Der Effekt trat nicht regelmäßig, aber doch meist und dann stets unmittelbar nach der intravenösen Injektion von Dosen in der Höhe von 1—20 mg je kg Körpergewicht ein. Die Dauer des Atemstillstandes konnte sich bis 20 sec ausdehnen. Er war unabhängig davon, ob gleichzeitig ein Blutdruckanstieg begann oder unmittelbar zunächst eine Blutdrucksenkung eintrat oder ob schließlich der Blutdruck sich gar nicht merklich änderte. Beispiele finden sich auf den Kurven 1—3. Die Atemhemmung wurde nicht abgeschwächt, wenn (an Ratten) die Carotis beiderseits an ihrer Teilungsstelle vom umgebenden Gewebe freipräpariert, also die Verbindung des Sinusnerven mit

* Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

dem Zentrum durchtrennt wurde. Dagegen hob Durchschneidung oder Kühlung beider Vagi den Effekt bei Meerschweinchen und Ratten immer, bei Katzen wiederholt auf. Wir sind zu der Ansicht gekommen, daß es sich um eine vom Kreislauf unabhängige Wirkung auf Receptoren in einem Gebiet handelt, aus dem Impulse im Sinne einer Atmungshemmung zentralwärts durch den Vagusstamm zu verlaufen pflegen.

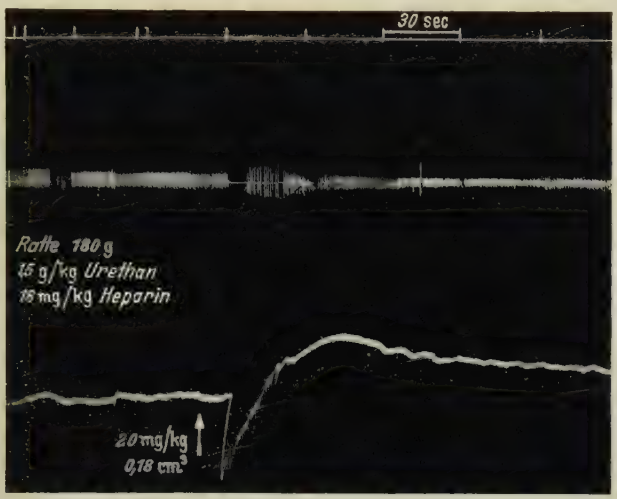


Abb. 1. Ratte, 180 g; 1,5 g Urethan und 18 mg Heparin je kg. Obere Kurve = Zeit, mittlere Kurve = Atmung, untere Kurve = Blutdruck, intravenöse Injektion von 20 mg je kg Cpa.

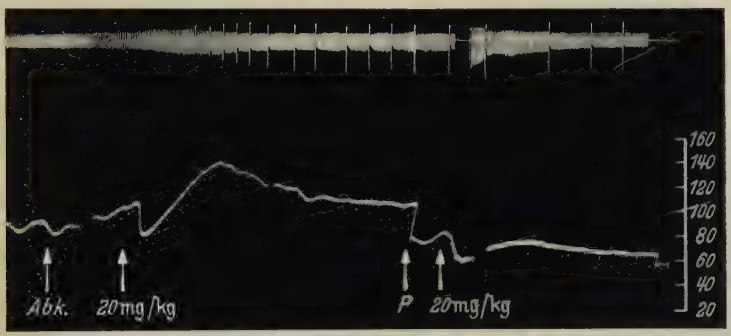


Abb. 2. Ratte, 230 g; 1,5 g Urethan und 7 mg polyäthylensulfosaures Natrium je kg. *Abk.* Abkühlung beider Vagusstämme; *P* Pause (Anhalten des Kymographions), während derselben Vaguskühlung eingestellt. Zweimalige intravenöse Injektion von 20 mg je kg Cpa.

Eine solche Vorstellung bietet ja nichts grundsätzlich Neues.

Wie Bucher in seiner zusammenfassenden Monographie ausgeführt hat, wird die über die Bahnen des Bezold-Jarisch-Reflexes verlaufende Atmungshemmung nicht nur durch Veratrum Alkaloide (Aviado et al. 1949, vgl. auch Mosey et al.), sondern auch durch Antihistaminica (Aviado et al. 1950), durch Derivate des

Phenyldiguanidins (Dawes und Mott), in gewissem Grade auch durch solche des Isothioharnstoffes (Dawes und Fastier) bewirkt.

Bucher knüpft an seinen Bericht folgende Sätze:

„Wenn die Spezifität der Receptoren geringer ist, dann ist umgekehrt die Möglichkeit entsprechend größer, daß der Reflex eine gewisse praktische Bedeutung erlangen könnte. Man wird nämlich, wenn auf intravenöse Injektion eines neuen Arzneistoffes eine Atmungshemmung auftritt, in Zukunft an einen Bezold-Jarisch-Reflex zu denken haben."

Wir glauben, daß unser Befund einen solchen Fall darstellt. Da die Substanz chemisch zu den adrenalinartigen Pharmaka gehört, scheint uns die Frage berechtigt, ob bei den nach Adrenalin beobachteten

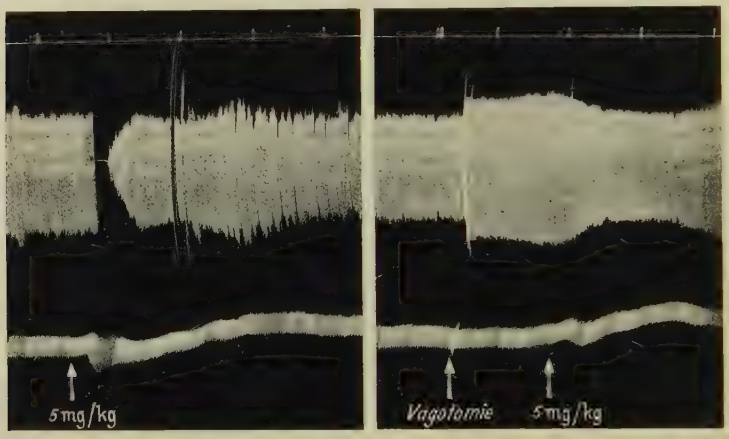


Abb. 3. Katze, 3,02 kg; 1,5 g Urethan und 18 mg Heparin je kg. Obere Kurve = Zeit (je 30 sec), mittlere Kurve = Atmung, untere Kurve = Blutdruck. Vor und nach Vagotomie je 5 mg je kg Cpa.

Störungen der Atmung, die gewöhnlich als indirekte Folgen der Gefäßwirkungen angesehen worden sind (vgl. z. B. Heymans und Bouckaert), nicht auch Wirkungen auf Receptoren im Spiele sind, die einen Reflex im Sinne von Bezold-Jarisch auslösen.

Weitere Einzelheiten über Wirkungen der besprochenen Substanz sind in der Dissertation (med. Freie Universität, Berlin 1953) von Dietrich Viessmann niedergelegt.

Literatur.

Aviado, D. M., jr., R. G. Pontius u. C. F. Schmidt: J. of Pharmacol. **97**, 420 (1949). — Aviado, D. M., jr., R. G. Pontius u. T. H. Li: J. of Pharmacol. **98**, 2; **99**, 425 (1950). Bucher, K.: Reflektorische Beeinflußbarkeit der Lungenatmung, S. 63ff. Wien: Springer 1952. — Dawes, G. S.: J. of Pharmacol. **89**, 325 (1947). — Dawes, G. S., u. J. C. Mott: Brit. J. Pharmacol. **5**, 65 (1950). —Dawes, G. S., and F. N. Fastier: Brit. J. Pharmacol. **5**, 323 (1950). — C. Heymans und J. J. Bouckaert: J. of Physiology **69**, 254 (1930). — Mosey, L., J. W. Stutzman and G. L. Maison: J. of. Pharmacol. **101**, 28 (1951). — Trendelenburg, P.: Heffters Handb. d. exper. Pharmakologie **2**, 1263 (1924).

Prof. Dr. W. Heubner, Berlin-Dahlem, Thielallee 69—73.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 43—51 (1953).

Dept. of Pharmacology, State University of Iowa, Iowa City, Iowa, U.S.A.

Papaverine Analogs. VI Relationship Between Chemical Structure and Coronary Vasodilator Action*.

By

CALVIN HANNA** and JAMES H. SHUTT.

With 4 Figures in the Text.

(Eingegangen am 26. Februar 1953.)

Recently a number of analogs of papaverine have been tested for coronary vasodilator activity and these studies are summarized in the following discussion. SHEPARD and NOTH[4] in the first of a series of papers on papaverine analogs, reported on the preparation and coronary vasodilator activity of all of the 6,7-dialkoxy-1-(3,4-dialkoxybenzyl) isoquinolines of the methoxy and ethoxy combinations.

They found that the substitution of ethoxy for methoxy groups did not profoundly alter the type or the extent of the physiological action of the molecule. Unfortunately the test method or animal used was not recorded. However, the value for the coronary dilator activity of 6,7-diethoxy-1-(3,4-diethoxybenzyl) isoquinoline hydrobromide, ethaverine hydrobromide, on a molar basis compares favorably with the value that WINDER et al.[10] reported for ethaverine hydrochloride using the isolated rabbit heart method of LANGENDORFF. In a continuation of this study, SHEPARD et al.[5] reported on the preparation of all of the 6,7-dialkoxy-1-(3,4-dialkoxybenzyl)-3-methylisoquinolines of the methoxy and ethoxy combinations. Of these sixteen 3-methylisoquinolines only the coronary dilator activity of 6,7-dimethoxy-1-(3-methoxy-4-ethoxybenzyl)-3-methylisoquinoline was reported. This compound as tested on the anesthetized dog by means of a rotameter was stated to be equal to papaverine in dilating the coronary arteries[3]. SHEPARD et al.[6] further prepared and tested eighteen papaverine analogs to study the effect of substituting alkoxy groups other than methoxy and ethoxy and the effect of the absence of an alkoxy group. This series also included all of the 6,7-dimethoxy-1-(dimethoxybenzyl) isoquinolines. Salts of these papaverine analogs[5] were examined for coronary dilator activity. In the limited number of compounds studied, it was found that the presence

* In honor of Professor OTTO LOEWI on his 80th birthday.

** This material was abstracted from a dissertation submitted to the Graduate College of the State University of Iowa by C. HANNA in partial fulfillment of the requirements for the degree Doctor of Philosophy. This work was supported by a grant from the Central Scientific Fund of the College of Medicine, State University of Iowa and was conducted during the tenure of a Life Insurance Medical Research Predoctoral Fellowship. Present address: Department of Pharmacology, University of Tennessee, Memphis, Tennessee, U.S.A. The authors wish to acknowledge the assistance given them by Dr. E. G. GROSS and the members of the Department of Pharmacology of the State University of Iowa. We wish to thank Dr. E. DE BEER of the Wellcome Research Laboratory for samples of five tetrahydroisoquinolines and Dr. K. K. CHEN of the Lilly Research Laboratories for samples of eighteen isoquinoline analogs of papaverine.

of a propoxy group or the absence of a methoxy group in the 4-position of the benzyl substituent or the combination of methoxy, ethoxy, and methylenedioxy groups in the 6,7-position of the isoquinoline ring yielded compounds with at least some activity and usually only small loss of activity depending on the individual compound studied. Up to the present time no systematic attempt has been made to learn the limits of the chemical structural requirement of papaverine for coronary dilator action.

The present report was designed primarily to determine the minimal effective chemical structure(s) necessary for the coronary dilator action of the isoquinoline derivatives of the papaverine type.

Methods and Materials.

Over one hundred twenty isolated beating rabbit hearts were perfused with oxygenated Lockes solution at a constant pressure (38 mm. of mercury) and temperature (38° Centigrade) by the method of Langendorff. The main coronary outflow was measured by means of a tipping bucket and recorded continuously with the ventricular contractions. The ratio of the dilating potency of a drug to that of papaverine was computed as the reciprocal ratio of respective doses required to give equal peak increases in flow. In general, the procedure of Winder *et al.*[10] for quantitatively comparing coronary vasodilator drugs was followed closely. The drugs were administered by quick injection, usually in 0.05 ml. of warm unbuffered Lockes solution with a long needle through a side arm into the center of the coronary inflow three centimeters above the coronary ostia. In the amounts used the effects of papaverine and the active analogs on the ventricular contraction and heart rate was usually small.

The effect of most of the papaverine analogs on the coronary blood inflow of the intact anesthetized dog was measured by means of a rotameter using the procedure as outlined by Winbury *et al*[9]. The actions of the papaverine analogs studied on the isolated rabbit heart were the same as those observed on the intact dog preparation. For this reason all quantitative values given in this report refer to those of the isolated rabbit heart.

The effects of some of the papaverine analogs on the heart contractile force of the dog was measured by the method of Walton *et al*[7]. The method consists essentially in the measurement of the isometric systolic tension transmitted to modified Cushney levers attached to the right ventricle of the dog under barbiturate anesthesia.

General Statement of the Problem.

Firstly, in an effort to establish a sound basis for further work on the coronary dilator action of the papaverine analogs, it would be advantageous to confirm by the combined test methods outlined above the reported results of previous investigators[3, 4, 5, 6, 10]. Secondly, in an effort to learn about the minimal effective chemical structure(s) necessary for the coronary vasodilator activity exhibited by the isoquinoline derivatives of the papaverine type the various groups on the papaverine structure were modified (Fig. 2: No. 1). The papaverine structure may be modified in at least six ways as outlined below:

1. The methyl ether groups may be removed, split or replaced by other groups.

2. The isoquinoline N-ring may be opened or selectively hydrogenated.

3. The nitrogen group may be changed from tertiary to primary, secondary or quaternary.

4. The position and number of methyl ether groups may be changed.

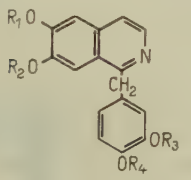
5. The benzyl substituent may be removed, changed or replaced by other groups.

6. The methylene bridge (—CH_2—) between the phenyl ring of the benzyl substituent and the isoquinoline ring may be multiplied n-times.

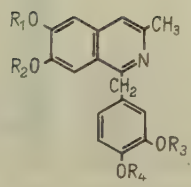
The number of compounds that could be prepared and studied is very large and for this report sixty-five compounds were studied which included at least one of each of the above six types.

Results and Discussion.

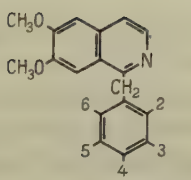
Of the forty-nine previously reported[3, 4, 5, 6, 10] papaverine analogs which were synthesized and in most instances studied for coronary vasodilator action, nineteen were tested qualitatively using the test methods outlined in the experimental section above. All nineteen of these compounds were confirmed as coronary dilators (Fig. 1).



No.	1	2	3	4	5	6	7
R_1	C_2H_5	CH_3	C_2H_5	CH_3	CH_3	CH_3	/
R_2	C_2H_5	CH_3	C_2H_5	CH_3	CH_3	CH_3	CH_2 \
R_3	C_2H_5	C_2H_5	CH_2	CH_3	CH_3	C_2H_5	\
R_4	C_2H_5	C_2H_5	CH_3	$_nC_3H_7$	$_{iso}C_3H_7$	H	CH_2 /



No.	8	9	10	11	12	13	14
R_1	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	CH_3	CH_3	CH_3
R_2	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	CH_3	CH_3	C_2H_5	CH_3
R_3	CH_3	C_2H_5	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	CH_3
R_4	CH_3	C_2H_5	CH_3	CH_3	C_2H_5	CH_3	C_2H_5



No.	15	16	17	18	19
Position					
$-OCH_3$	2	2	2	2	3
$-OCH_3$	3	4	5	6	5

Fig. 1. Some previously reported papaverine analogs [3–6].

The results of the part of the problem concerned with finding the minimal effective chemical structure(s) necessary for the coronary dilator action of the isoquinoline derivatives of the papaverine type are separated into three parts corresponding to Figs. 2—4.

Effect of Modifying the Isoquinoline N-Ring and Ring Nitrogen.

The saturation of the 3,4-double bond of the papaverine molecule to give 3,4-dihydropapaverine decreased the activity. The saturation of both the 1,2- and the 3,4-double bonds to give 1,2,3,4-tetrahydropapaverine (in which the ring nitrogen is now secondary) produced a further decrease in activity (Fig. 2; Nos. 1, 2, 3, 4). The N-methylation of papaverine to give N-methylpapaverine in which the ring nitrogen is now quaternary resulted in complete loss of activity (Fig. 2; No. 5) and a

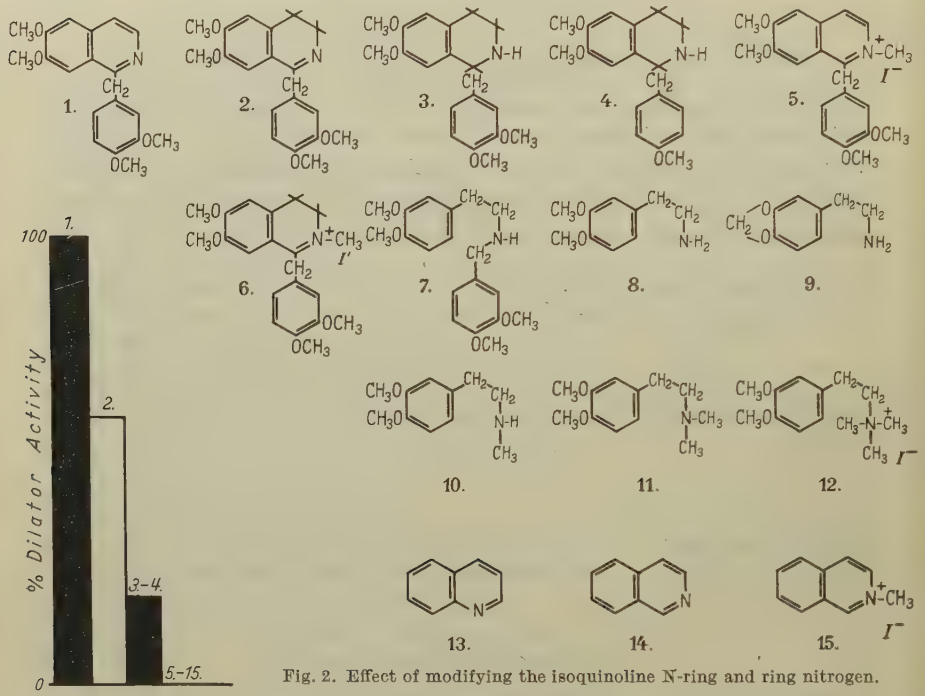


Fig. 2. Effect of modifying the isoquinoline N-ring and ring nitrogen.

similar loss of activity was noted when 3,4-dihydropapaverine was N-methylated (Fig. 2; No. 6).

A large number of open chain analogs of tetrahydropapaverine have been prepared and studied for antispasmodic activity. Some of these open chain analogs were found to be more active than papaverine as general antispasmodics[1]. However, N-veratrylhomoveratrylamine, an open chain analog of papaverine, was found to be inactive on the coronary bed (Fig. 2; No. 7). The smaller components of the papaverine structure such as the β-3,4-dialkoxyphenethylamines (in which the amino group was varied from primary to secondary, tertiary and quaternary (Fig. 2; Nos. 8—12) were also ineffective in increasing the coronary flow. Further,

the papaverine analogs in which the benzyl substituent and the 6,7-dimethoxy groups were absent were also inactive (Fig. 2; Nos. 13—15). A study of the limited number of compounds in Fig. 2 reveals that the isoquinoline N-ring of papaverine may be dihydro- or tetrahydro- but preferably aromatic. The N-ring may not be opened to give an open chain analog. The nitrogen group of papaverine may be secondary or preferably tertiary but not primary or quaternary.

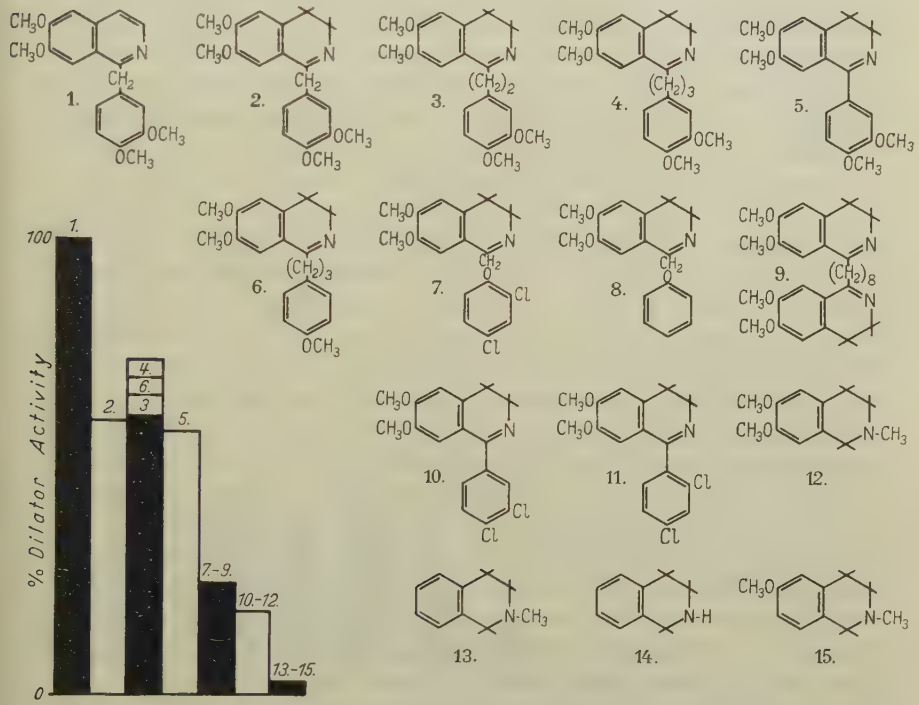


Fig. 3. Effect of modifying the methylene group and the benzyl substituent.

Effect of Modifying the Methylene Group and the Benzyl Substituent.

The coronary dilator activity of 3,4-dihydropapaverine, (1-(3,4-dimethoxyphenyl*methyl*)-3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisoquinoline), was changed slightly by changing the number of *methyl*ene groups (—CH_2—) between the phenyl ring of the benzyl substituent and the isoquinoline ring. Activity was increased by increasing the number of methylene groups to at least three groups (Fig. 3; Nos. 3, 4, 6). Conversely the removal of the methylene group to give 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisoquinoline (Fig. 3; No. 5) lowered the dilator activity slightly.

A number of papaverine analogs were studied for dilator activity in which the benzyl substituent of 3,4-dihydropapaverine (Fig. 3; No. 2)

was replaced by other groups. This replacement included such substituents as phenoxymethyl, 2,4,5-trichlorophenoxymethyl, 3,4-dichlorophenyl, methyl, hydrogen, etc. (Fig. 3; Nos. 7—12). All of these compounds exhibited coronary dilator activity so long as the 6,7-dimethoxyisoquinoline nucleus was present. To this list may be added the six 1-(*dimethoxybenzyl*)-6,7-dimethoxyisoquinolines (Fig. 1; Nos. 15—19) studied by Shepard et al.[6]. The optimum position for the dimethoxy groups of the benzyl substituent was that of papaverine itself, 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-6,7-dimethoxy isoquinoline. A study of the limited number of compounds in Fig. 3 reveals that the methylene group between the phenyl ring of the benzyl substituent and the isoquinoline ring of papaverine may be multiplied *n*-times with little change in activity. In general, the benzyl substituent of papaverine may be removed, changed or replaced by other groups without complete loss of activity.

Effect of Removal, Rearrangement and Replacement of the Methoxy Groups.

The coronary dilator activity of 3,4-dihydropapaverine was lowered slightly when the methoxy group in the three position of the benzyl substituent was replaced by a hydrogen group (Fig. 4; 2, 3). Similarly, Shepard et al.[6] noted that the dilator activity of papaverine was lowered slightly when the methoxy group in the four position of the benzyl substituent was replaced by a hydrogen group. The removal of both methoxy groups from the benzyl substituent lowered the activity of 3,4-dihydropapaverine considerably (Fig. 4; No. 4). However, on reversing the above situation and removing both methoxy groups from the isoquinoline nucleus and leaving both methoxy groups on the benzyl substituent (Fig. 4; No. 5), the dilator activity of 3,4-dihydropapaverine was lowered to such an extent that only an occasional weak dilatation was produced. Since the dimethoxy groups on the benzyl substituent may exhibit some dilator activity it was necessary to compare the various 1-benzyl-3,4-dihydrodimethoxyisoquinoline compounds to determine the optimum arrangement of dimethoxy groups on the isoquinoline nucleus. Of the six possible 1-benzyl-3,4-dihydrodimethoxyisoquinoline compounds the 5,7- or 7,8-dimethoxy analogs could not be prepared by conventional synthetic methods[8]. Of the 1-benzyl-3,4-dihydrodimethoxyisoquinoline analogs studies the 6,7 dimethoxy combination was the most active with the 5,6-dimethoxy arrangement intermediate while the 5,8-dimethoxy analog was inactive (Fig. 4; Nos. 4, 6, 7, 8). Further, 1-benzyl-3,4-dihydro-6,7,8-trimethoxyisoquinoline (Fig. 4; No. 10) was as active as 1-benzyl-3,4-dihydro-6, 7-dimethoxyisoquinoline (Fig. 4; No. 4). Of the moderately active papaverine analogs studied, all contained at least the 6-methoxyisoquinoline nucleus. Of the possible papaverine analogs with the monomethoxyisoquinoline nucleus, only the 6-methoxy

analogs could be prepared. The compound 1-(4-methoxybenzyl)-3,4-dihydro-*6-methoxy*isoquinoline (Fig. 4: No. 9) was weakly active in increasing coronary flow. The removal of all of the methoxy groups from papaverine to give 1-benzyl-isoquinoline or 1-benzyl-3,4-dihydroisoquinoline (Fig. 4; No. 11) resulted in a complete loss of activity.

Concerning the ether groups that may be substituted for the methoxy groups on the isoquinoline ring of papaverine only compounds con-

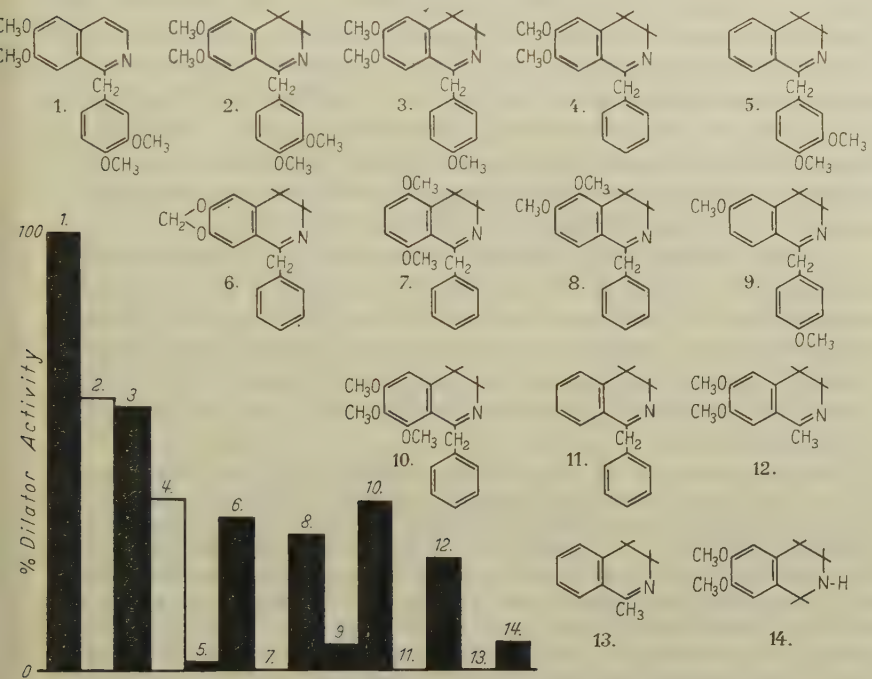


Fig. 4. Effect of removal and rearrangement of the methoxy groups.

taining three groups have been studied for coronary dilator activity. These included ethoxy, methylenedioxy and *n*-butoxy (Fig. 1; Nos. 1, 2, 7, 9, 10, 11, 12 and others reported by Shepard et al.[6]). Two interesting papaverine analogs with butyl ether groups, prepared during this study, are 1-benzyl-3,4-dihydro-6-ethoxy-7-*n*-butoxyisoquinoline and 1-benzyl-3,4-dihydro-6-methoxy-7-*n*-butoxyisoquinoline. These two analogs of papaverine exhibited characteristics (type of dilator activity, molecular weight and solubility characteristics) more like those of ethaverine and papaverine than like those of the structurally related compound 1-benzyl-3,4-dihydro-6,7-dimethoxyisoquinoline (Fig. 4; No. 4). The extent to which the methyl ether groups on the isoquinoline ring of papaverine may be replaced by other ether groups has only been scantily investigated[8].

A pharmacologically interesting compound results from the demethylation of papaverine to give papaveroline, (1-(3,4-dihydroxybenzyl)-6,7-dihydroxyisoquinoline). In several times the amounts of papaverine which elicited good coronary dilatation, papaveroline had little or no effect on the coronary flow except to block the dilator action of subsequent doses of papaverine. Papaveroline is competitive with papaverine (and the blockade is of short duration) as long as the amounts injected are small and properly spaced. However, large repeated doses of papaverine injected as soon as the effect of previous dilator doses of papaverine have ceased will soon give a diminished response and occasionally the isolated rabbit heart stops in fibrillation. Unfortunately, the tetraacetate of papaveroline hydrobromide was too insoluble in water to be tested. The blocking action of papaveroline was not exhibited by the dihydroxy compounds catechol, resorcinol or hydroquinone or were these materials coronary vasodilators.

A study of the limited number of compounds in Fig. 4 reveals that the optimum arrangement of the dimethoxy groups on the isoquinoline nucleus is that of the 6,7-position. The coronary dilator activity of papaverine decreases as methoxy groups are removed one at a time starting with the methoxy groups on the benzyl substituent. The methoxy groups may be replaced by other alkoxy groups but not by hydroxy or hydrogen groups.

Two compounds were left out of the discussion of chemical structure and coronary dilator action because they markedly reduced the contractile force of the heart *in vitro* and *in vivo*. Care should be taken in eliminating a compound as a coronary dilator because of its effects on the heart contractile force, especially of the isolated heart, for the following reasons. The compounds, 1-benzylisoquinoline and 1-benzyl-3, 4-dihydroisoquinoline, decreased the strength of the ventricular contraction of the isolated rabbit heart to the same degree in the same dosage range as did papaverine, but unlike papaverine they did not increase the coronary flow. In like manner, the effects of papaverine and ethaverine on the strength of the ventricular contractions occurred at the same time and to the same degree, yet the dilator effect of ethaverine did not usually occur until the strength of the ventricular contractions had returned to normal. The reason for eliminating the compound, 6, 7-dimethoxy-1-(2, 5-dimethoxybenzyl)-3, 4-dihydroisoquinoline, from this discussion of chemical structure and dilator action was because the increase in coronary flow produced by this compound occurred gradually and remained high as long as the strength of the ventricular contractions was depressed giving a higher value for the dilator potency of this compound[2] than would be expected from a study of similar analogs[6].

The isolated heart perfusion technique is a relatively easy one and was used to screen and quantitatively test the papaverine analogs on at a time or in combinations. With the *in vivo* dog heart, using the rotameter to measure changes in coronary flow, it was difficult to repeatedly achieve a highly satisfactory preparation and for that reason more than one papaverine analog was tested at a time.

The active papaverine analogs were considered to act by the same mechanism on the coronary vessels when they fulfilled the following

experimental requirements: a) when they increased the coronary flow of the isolated rabbit heart without markedly changing the heart rate or the strength of the ventricular contractions, b) when they increased the coronary inflow of the anesthetized dog as measured by the rotameter, c) and when they maintained the heart contractile force at nearly a constant level in the anesthetized dog preparation on slow intravenous administration.

Summary.

The coronary vasodilator action of sixty-five papaverine analogs was studied in an effort to learn more about the effective chemical structure(s) responsible for this type of action. The compounds were studied on the isolated rabbit heart by the method of LANGENDORFF and in the anesthetized dog using the rotameter to measure changes in coronary flow.

Coronary dilator action was noted only in those papaverine analogs with the *6-alkoxy*, *5,6-dialkoxy* or *6,7-dialkoxy* (preferable) isoquinoline nucleus. However, using present synthetic methods (the BISCHLER-NAPIERALSKI reaction or the PICTET-SPENGLER reaction) it has not been possible to prepare papaverine analogs having the 5-, 7-, 8-monoalkoxy or the 5,7-; 7,8- dialkoxy isoquinoline nucleus. The 6,7-dioxy groups studied were methoxy, ethoxy, methylenedioxy and *n*-butoxy. The isoquinoline N-ring may be 3,4-dihydro; 1,2,3,4-tetrahydro or aromatic (preferable). The nitrogen group of the isoquinoline ring may be secondary or tertiary (preferable) but not primary or quaternary. Papaverine is 6,7-dimethoxy-1-(3,4-dimethoxyphenyl *methyl*) isoquinoline. The dimethoxyphenyl group may be rearranged or replaced by other groups without complete loss of activity. The *methyl* group may be multiplied *n*-times within the studied limit from zero to three.

Bibliography.

[1] BLICKE, F. F.: Ann. Rev. Biochem. **13**, 549 (1944). — [2] HANNA, C., and SHUTT, J.: Fed. Proc. **11**, 354 (1952). — [3] HENDERSON, F. G., R. E. SHIPLEY and K. K. CHEN: J. Amer. Pharm. Assoc. (Sci. Ed), **60**, 207 (1951). — [4] SHEPARD, E. R., and J. F. NOTH: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4364 (1950). — [5] SHEPARD, E. R., J. F. NOTH, H. D. PORTER and C. K. SIMMONS: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 4611 (1952). — [6] SHEPARD, E. R., H. D. PORTER, J. F. NOTH and C. K. SIMMANS: J. Org. Chem., **17**, 568 (1952). — [7] WALTON, R. P., M. DE V. COTTON, H. H. BRILL and P. C. GAZES: Amer. J. Physiol. **161**, 489 (1950). — [8] WHALEY, W. M., and T. R. GOVINDACHARI: „Organic Reactions", Vol. 6, pp. 74—190. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1951. — [9] WINBURY, M. M., P. M. MICHIELS, W. E. HAMBOURGER, W. J. STOCKFISCH and D. L. COOK: J. of Pharmacol. **99**, 343 (1950). — [10] WINDER, C. V., R. W. THOMAS and O. KAMM: J. of Pharmacol. **100**, 482 (1950). — WINDER, C. V., and M. E. KAISER: J. of Pharmacol. **93**, 86 (1948).

Dr. CALVIN HANNA, University of Tennessee, Department of Pharmacology, Medical Units, Memphis 3, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 52—61 (1953).

Aus dem Laboratorium für therapeutische Chemie, Istituto Superiore di Sanita, Roma.

Bis-(2-Diaethylaminoaethyl)-benzoldicarbonsäureester-dialkyljodide als spezifische Hemmstoffe der True-Cholinesterase und der Pseudo-Cholinesterase*.

Von

F. Bovet-Nitti und D. Bovet.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. März 1953.)

Das Bild, das wir uns heute über die Cholinesterase-Inhibitoren machen, findet seinen Ursprung in einer Arbeit von Loewi u. Navratil[25] aus dem Jahre 1926, diese war die 11. einer Reihe über die humorale Übertragung der Nerventätigkeit. Als Bestätigung der experimentellen Ergebnisse von Führer[15] und Fröhlich[14] bemerkten die Autoren eine Wirkungssteigerung des Acetylcholins unter dem Einfluß von Eserin. Sie stellten unter anderem fest, daß bei Verlängerung der Acetylcholinwirkung, hervorgerufen durch die Anwesenheit von Eserin, das Acetylcholin durch den Herzmuskel schwerer hydrolysierbar ist.

Die enzymatische Natur der Cholinesterasewirkung wurde wenig später von Engelhardt u. Loewi[2] und von Matthes[26] beschrieben. 1943 zeigten Mendel, Mundell u. Rudney[28] den Unterschied der Empfindlichkeit der Erythrocyten-Cholinesterase (True-Cholinesterase) und der Serum-Cholinesterase (Pseudo-Cholinesterase) gegenüber Eserin und fast gleichzeitig bemerkten Zeller u. Bissegger[33], daß Coffein und Percain das Serumferment ebenfalls viel stärker hemmen als die Erythrocyten- und Hirnfermente.

Die Bezeichnung Acetylcholinesterase, von Nachmansohn u. Augustinson eingeführt[3, 29], für True-Cholinesterase, wurde später von verschiedenen angelsächsischen Autoren übernommen[23].

Die späteren Arbeiten ließen dann erkennen, daß der größte Teil der Inhibitoren die Pseudo-Cholinesterase viel stärker beeinflußt als die True-Cholinesterase und daß Di-isopropyl-fluorophosphat ebenfalls eine spezifische Wirkung auf dieses Enzym ausübt. Das Bestehen von Inhibitoren, die die True-Cholinesterase stärker hemmen als die Pseudo-Cholinesterase, wurde erst in allerletzter Zeit erkannt. Die wichtigsten Beiträge zu dieser Erkenntnis lieferten Adams u. Thomson[1] mit β,β,-Dichlorodiäthyl-N-methylamin, Hawkins u. Mendel[19] mit dem N-p-Chlorphenyl-N-methyl-carbaminsäureester des m-Oxyphenyl-trimethylammoniums, Dayrit, Manry u. Seevers[11] mit Hexaäthyltetraphosphat und Burgen[8] mit dem Dijodomethylat des bis-(4-Dimethylaminophenyläthyl)-ketons.

* Herrn Professor Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Im Verlaufe einer Reihe von Untersuchungen über synthetische Verbindungen mit Curarewirkung konnten wir Anomalien im Verhalten einiger Derivate gegenüber der decurarisierenden Wirkung des Eserins, wie auch ungewöhnliche sekundäre Vergiftungserscheinungen beim Hund, bemerken[5]. Die Versuche zur Aufklärung des Mechanismus dieser Sekundärwirkungen führten zur Feststellung, daß das Dijodomethylat des bis-(2-Di-äthylaminoäthyl)-phenyldicarbonsäureesters (I), das ortho-Derivat der Phthalsäure, spezifisch die Pseudocholinesterase hemmt, während das para-substituierte Isomere — ein Terephthalsäurederivat (III) — ausschließlich die True-Cholinesterase hindert[6].

Es schien interessant, das pharmakologische Studium der 2 Phthalsäure- und Terephthalsäureester, deren Anticholinesterase-Eigenschaften schon früher beschrieben wurden, wieder aufzunehmen und mit einigen chemisch ähnlichen Derivaten fortzusetzen.

In dieser Arbeit werden dann auch die Eigenschaften des Dijodopropylats des bis-(2-Diäthylaminoäthyl)-phthalates (II) und des Dijodopropylats des bis-(2-Diäthylaminoäthyl)-terephthalates (IV) besprochen.

Technischer Teil.

Bei den Versuchen in vitro wurde zur Bestimmung der Anticholinesterasewirkung die Warburgsche manometrische Methode angewendet. Alle Versuche wurden unter denselben experimentellen Bedingungen ausgeführt. Das Substrat (1,5 cm^3) wurde in den Hauptraum gebracht, das Enzym oder die Mischung von Enzym und Inhibitor (0,5 cm^3) wurden in den Anhang gegeben. Bei diesem Vorgehen befanden sich Enzym und Inhibitor schon miteinander in Berührung, bevor sie dem Substrat beigefügt wurden und vor dem Beginn der Messungen. Wie Burgen[8] zeigte, kann die Reihenfolge des Beifügens die Reaktion quantitativ beeinflussen. Als Salzlösung wurde die Lösung Ringer 20 angewendet (NaCl 0,9%: 100 cm^3; KCl 1,2%: 2 cm^3; $CaCl_2$ 1,76%: 2 cm^3; $NaHCO_3$ 1,26%: 20 cm^3)[2].

Als Pseudo-Cholinesterasequelle wurden verschiedene frisch zubereitete Verdünnungen von Pferde- oder Hundeserum, als Quelle der True-Cholinesterase Ochsenerythrocyten und das elektrische Organ des Torpedo marmorata und T. ocellata verwendet. Die Erythrocyten wurden nach Zentrifugation 4mal mit physiologischer Lösung gewaschen. Die den Fischen entnommenen elektrischen Organe wurden in einer 4mal ihrem Gewicht entsprechender Salzlösung nach Pantin homogenisiert[30].

Die Versuche über die Enzyme der Säugetiere wurden bei 37°, diejenigen über die Fischenzyme bei 27° durchgeführt.

Die pharmakologischen Untersuchungen am lebenden Tier, Hund und Kaninchen, wurden nach der üblichen Methode durchgeführt.

Experimenteller Teil.

1. Versuche in vitro. Wirkung auf die True-Cholinesterase und auf die Pseudo-Cholinesterase.

Die Wirkung der Dijodoäthylate des bis-(2-Diäthylaminoäthyl-phthalates (306 I. S.) und des bis-(2-Diäthylaminoäthyl)-terephthalates (302 I. S.) wurde schon früher beschrieben. Wir beschränken uns hier

auf die Angaben der Eigenschaften ihrer höheren Homologen: 449 I. S. [Dijodopropylat des bis-(2-Diäthylaminoäthyl-phthalates)] und 452 I. S. [Dijodopropylat des bis-(2-Diäthylaminoäthyl)-terephthalates].

Cholinesterasewirkung. Die studierten Ester, werden ebenso wie die Ester des Benzoylcholins, denen sie chemisch nahe verwandt sind, durch die True-Cholinesterase nicht hydrolysiert.

Die Pseudo-Cholinesterase hydrolisiert das para-substituierte Derivat 452 I. S. mit einer Geschwindigkeit, welche ungefähr 20% der Hydrolysegeschwindigkeit des Benzoylcholins entspricht.

Das ortho-substituierte Derivat 449 I. S. wird durch das Enzym weniger stark angegriffen.

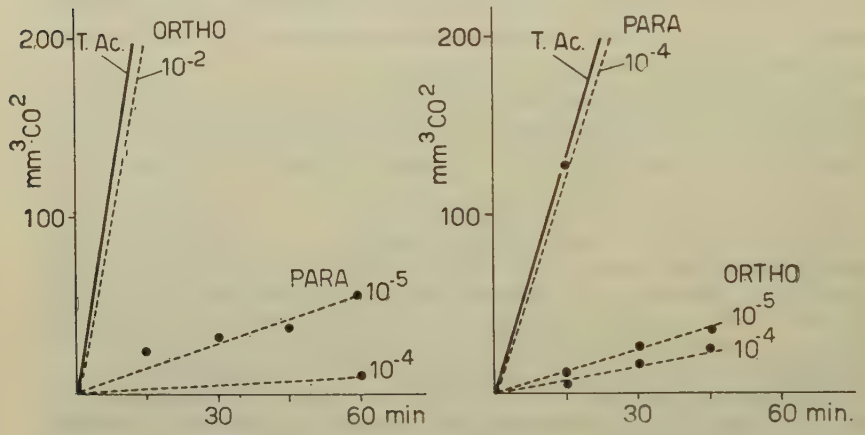


Abb. 1. Hydrolyse des Acetylcholins durch die Cholinesterase bei Abwesenheit (Ac) und bei Anwesenheit der Isomeren ORTHO (449 I. S.) und PARA (452 I. S.) des bis (2-Diäthylaminoäthyl)-benzoldicarbonsäureester-diäthyljodides (Warburg-Ammonsche Methode). a) Wirkung auf die True-Cholinesterase aus dem elektrischen Organ des Torpedo marmorata. Acetylcholin-bromid 0,5%; Extrakt aus dem elektrischen Organ 2%. b) Wirkung auf die Pseudo-Cholinesterase aus Pferdeserum; Acetylcholinbromid 0,5%; Serum 20%.

Hemmung der Pseudo-Cholinesterase. Die Hydrolyse des Acetylcholins durch Serum-Pseudo-Cholinesterase aus Pferde- oder Hundeserum wird schon durch schwache Konzentrationen des ortho-substituierten Derivates 449 I. S. gehemmt, eine Hemmung von 50% der Fermentwirkung wird schon bei der Verdünnung von 1/1000000 bemerkt.

Das para-substituierte Derivat 452 I. S. hat im Vergleich zum letzteren eine schwache Wirkung und hemmt die Fermentwirkung erst bei einer Konzentration von etwa 1/100.

Hemmung der True-Cholinesterase. Das para-substituierte Derivat 452 I. S. wirkt ungefähr 10000mal aktiver auf die True-Cholinesterase als auf die Pseudo-Cholinesterase; bei einer Konzentration von 1/1000000 wird die Fermentwirkung um 50% gehemmt. Die Wirkung erstreckt

sich stärker auf das Ferment, das im elektrischen Organ des Fisches vorkommt, als auf dasjenige, das sich in den roten Blutkörperchen des Ochsen befindet.

Was das ortho-substituierte Derivat 449 I. S. betrifft, zeigt es sich selbst bei sehr hohen Konzentrationen den Enzymen des elektrischen Fisches sowie den Blutkörperchen gegenüber vollständig inaktiv.

Vergleich der erhaltenen Resultate. Die beschriebenen Versuche bestätigen und erweitern die schon früher veröffentlichten Feststellungen über den spezifischen Unterschied der Hemmwirkung der Phthal- und Terephthalsäureester gegenüber den 2 Cholinesterasetypen[6].

Unter den quaternären Ammoniumderivaten der ortho-Phthalsäure stellt das Jodopropylat (449 I. S.) einen aktiveren spezifischen Inhibitor der Pseudo-Cholinesterase dar, als das entsprechende Jodoäthylat (306 I. S.).

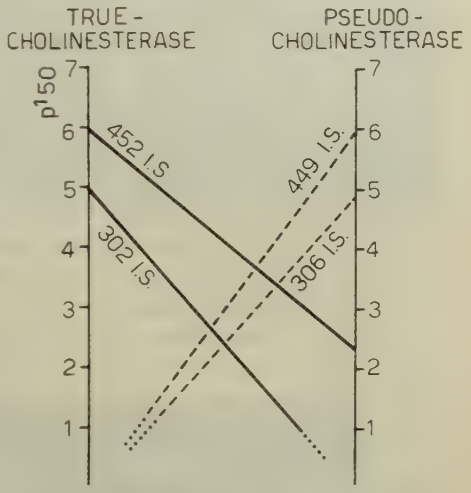


Abb. 2. Zusammenfassung der erhaltenen Resultate mit den vier selektiven Cholinesterase. Inhibitoren. Unterbrochene Linie -----: Orthosubstituierte Derivate. 306 I. S. Dijodoäthylat des bis (2-Diäthylaminoäthyl)-phthalates 449 I. S. Dijodopropylat des bis (2-Diäthylaminoäthyl)phthalates. Ausgezogene Linie ——: Para-subustituierte Derivate: 302 I. S. Dijodoäthylat des bis (2-Diäthylaminoäthyl)-terephthalates 452 I. S. Dijodopropylat des bis (2-Diäthylaminoäthyl)-terephthalates. Experimentelle Bedingungen wie Fig. 1. Die Angaben der logarithmischen Ordinaten entsprechen den Konzentrationen, die eine 50%-Hemmung der Enzymwirkung hervorrufen (pI_{50}).

Dasselbe findet man bei den Terephthalsäurederivaten, wo das 452 I. S. ein aktiverer Hemmstoff ist als das 302 I. S. Aber in diesem Fall zeigt es sich, daß der wirksamere Inhibitor nicht vollständig spezifisch wirkt, weil sich seine Wirkung, obwohl in weniger starkem Maße, auch auf die Pseudo-Cholinesterase erstreckt. Die Abb. 1 zeigt die verschiedenen Resultate.

2. Versuche in vivo.

Wirkung auf Ratte und Kaninchen. Die Toxizität der verschiedenen Phthalsäure- und Terephthalsäureester wurde am Kaninchen und an der Ratte bestimmt. Die para-substituierten Derivate sind toxischer als die ortho-Derivate. Die Ergebnisse zeigen aber, daß diese Verbindungen keine reine Eserinwirkung aufweisen, da nämlich der Tod nach Curarisation infolge Asphyxie eintreten kann.

Um Nebenwirkungen, die eventuell von der Asphyxie herrühren könnten, auszuschalten, wurde die Wirkung dieser Verbindungen auf

das curarisierte Kaninchen geprüft, das durch künstliche Atmung am Leben erhalten wurde. Bei einer Dosis von 10 mg/kg intravenös der Derivate 306 I. S. und 449 I. S. konnten keine cholinergischen Intoxikationserscheinungen bemerkt werden. Als Folge der Injektion von 10 mg 302 I. S. wurde leichter Speichelfluß (0,5 cm^3) beobachtet, reichlicher Speichelfluß (2—3 cm^3) folgte nach Verabreichung derselben Menge der Verbindung 452 I. S.

Wirkung auf den isolierten Kaninchendarm. Am isolierten Kaninchendarm verursachen die 4 studierten Derivate eine ziemlich andauernde Tonuserhöhung, welche durch Erneuerung der Tyrode-Lösung leicht rückgängig gemacht werden kann. Die ausgelöste Kontraktion besitzt immer eine kleine Amplitude, sie ist nicht von der Dosis des verwendeten Produktes abhängig und zeigt sich nicht immer bei wiederholter Verabreichung derselben Dosis. Die aktiven Konzentrationen sind ungefähr 0,1—10 mg/l. Sehr hohe Dosen können eine Verkleinerung der Amplitude der Peristaltik und des Tonus verursachen, aber diese lähmenden Einflüsse können leicht aufgehoben werden.

Die Wirkung des Acetylcholins kann nicht verstärkt, aber bei Anwendung starker Konzentrationen der Verbindungen 306 I. S., 449 I. S. und 302 I. S. verkleinert werden.

Wirkung auf den narkotisierten Hund. Am Hund in Chloralose-Narkose (0,15 g/kg intravenös) wurde bei möglichst vergleichbaren Bedingungen die Wirkung der verschiedenen Phthal- und Terephthalsäureester auf die Herztätigkeit und den Blutdruck untersucht.

Ferner studierten wir die Rückwirkungen, welche die Injektionen dieser Ester auf die Empfindlichkeit des Tieres gegenüber Acetylcholin und auf den kardiomoderativen Effekt bei Reizung des peripheren Endes des bei Halshöhe herauspräparierten N. vagus nach sich ziehen.

Derivate der Phthalsäure: 306 I. S. und 449 I. S. Auf intravenöse Verabreichung des 306 I. S. und des 449 I. S. folgt nur eine geringe kurzdauernde Hypotension, ohne daß eine Bradykardie auftritt.

Bei der Injektion von Acetylcholin zeigen die beiden Verbindungen 306 I. S. und 449 I. S. recht verschiedene Wirkungen.

Das Derivat 306 I. S. mildert oder verhindert bei relativhohen Dosen (1—10 mg/kg) die durch Injektion von schwachen Dosen von Acetylcholin (0,0001—0,01 mg) hervorgerufene Hypotension, und wirkt gegen den Auriculoventrikularblock und die Bradykardie, welche beim normalen Hund nach Verabreichung von 0,02—0,1 mg Acetylcholin-Chlorid auftreten. Das Derivat 449 I. S. zeigt weniger atropinähnliche Wirkung. Nur die Herzwirkung des Acetylcholins scheint bei einer hohen Dosis dieses Phthalsäureesters herabgesetzt zu werden, während die Hypotension nach schwachen Acetylcholindosen durch ihn eher gesteigert wird.

Die beiden Verbindungen vermindern die Vagusreizbarkeit und verursachen bei einer Dosis von 0,5—1 mg eine partielle, vorübergehende und bei höheren Dosen eine vollständige, andauernde Vaguslähmung.

Derivate der Terephthalsäure: 302 I. S. und 452 I. S. Im Unterschied zu den Phthalsäurederivaten verursachen die Terephthalsäurederivate bei schwachen Dosen charakteristische Anzeichen eines parasympathischen Hypertonus, Blutdrucksenkung und Bradykardie. Die über-

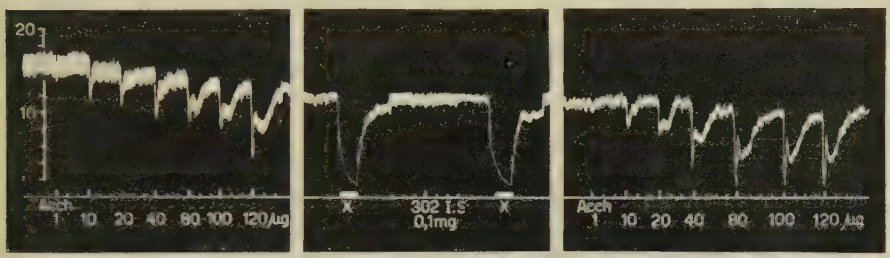


Abb. 3. Wirkung des 306 I. S., Pseudo-Cholinesteraseinhibitor, auf die Blutdruckveränderung nach Acetylcholin (Acch) und Vagusreiz (X). Die Acetylcholinhypotension wird vergrößert und verlängert nach Verabreichung von 306 I. S., während die Vagusreizbarkeit unverändert bleibt. Hund, ♀, 16 kg, Chloralose-Narkose; Carotisdruckregistrierung mit dem Manometer von LUDWIG; Vagusstimulation durch Thyratron; Injektion i. v. in die Saphena; Dosis in µg und in mg/kg; Zeit in Minuten. Während des Vagusreizes wird die Kurve mit größerer Geschwindigkeit aufgezeichnet (Reizdauer 10 sec).

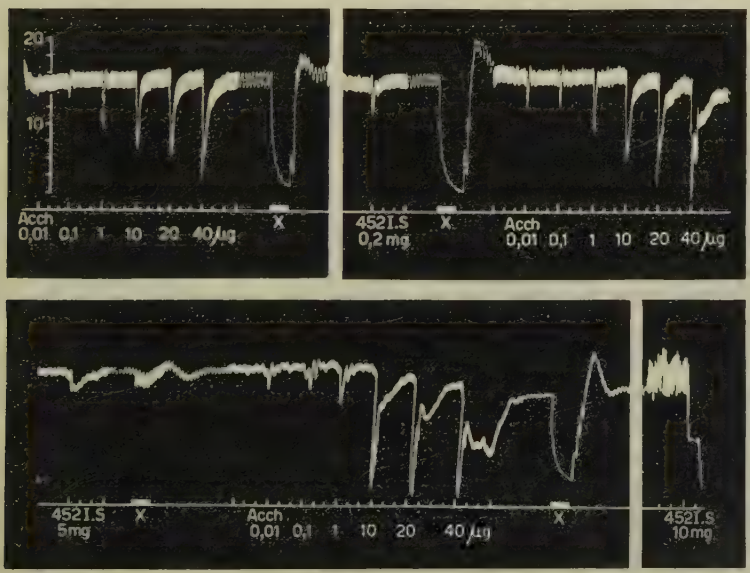


Abb. 4. Wirkung des 452 I. S., True-Cholinesteraseinhibitor, auf den Blutdruck nach Acetylcholin (Acch) und Vagusreiz (X). Die Verabreichung von 452 I. S. sensibilisiert das Tier für die Wirkung von schwachen Acetylcholindosen und verlängert die vagale Herzhemmung über die Zeit des Vagusreizes hinaus. Hund, ♀, 15 kg; experimentelle Bedingungen wie Abb. 3.

leitungserschwerende Dosis von Acetylcholin, welche ein deutliches Kriterium darstellt, erniedrigt sich regelmäßig nach der Verabreichung von 0,1 und 0,2 mg 302 I. S. oder 452 I. S.

Die bei diesem Test festgestellte Acetylcholinaktivität ist 4mal größer; der frequenzmindernde Effekt, welcher beim normalen Tiere nach Injektion einer Dosis von z. B. 0,04 mg/kg Acetylcholin erscheint, wird schon bei 0,01 mg Acetylcholin bemerkt, wenn das Tier vorangehend mit 302 I. S. oder 452 I. S. behandelt worden ist.

Parallel zum Herzeffekt werden auch die hypotensiven Effekte gleich vergrößert; die hypotensive Minimaldosis kann beim Hund von 0,001 mg/kg auf 0,0001 mg, von 0,01 auf 0,0001 oder von 0,0001 auf 0,000005 mg fallen; in diesem Falle wurde die Acetylcholinmenge auf das 10—100fache verkleinert.

Die Herzreaktion nach peripherem Vagusreiz zeigt sich einerseits in einer Herabsetzung der Reizschwelle und andererseits in einer Verlängerung des Herzstillstandes und der Bradykardie auch über das Andauern des Vagusreizes hinaus.

In den deutlichsten Versuchen hält die Nachwirkung z. B. bei einem der mit 452 I. S. behandelten Tiere nach einem 10 sec dauernden Vagusreiz 6 sec an. — Die Abb. 4 zeigt deutlich diese Eigenschaften.

Schlußfolgerung.

Obwohl deutliche Unterschiede unter den pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen Anticholinesterasestoffen bemerkt wurden, scheint es, daß bis heute kein systematischer Vergleich der Eigenschaften der Inhibitoren der True-Cholinesterase und der Pseudo-Cholinesterase gezogen wurde.

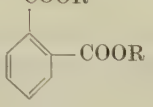
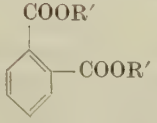
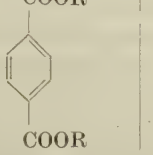
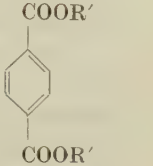
Es schien, daß die vergleichende Zusammenstellung der pharmakologischen Eigenschaften der beiden Gruppen chemisch ähnlicher Phthalsäure- und Terephthalsäureester, welche spezifisch die Pseudo- und die True-Cholinesterase hemmen, geeignet sei, einige Punkte der physiologischen Aufgabe des einen oder des andern dieser beiden Fermente aufzuklären.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen den Unterschied der pharmakologischen Eigenschaften, der zwischen den beiden isomeren Phthalsäureestern besteht, sehr deutlich:

a) Die Derivate der Phthalsäure (306 I. S. und 449 I. S.), Inhibitoren der Pseudo-Cholinesterase, vergrößern nur schwach und in nicht konstanter Weise die Wirkung des intravenös verabreichten Acetylcholins. Sie steigern die Vaguserregbarkeit nicht und verursachen keinen Symptom parasympathischer Hypertonus.

b) Die Derivate der Terephthalsäure (302 I. S. und 452 I. S.), Inhibitoren der True-Cholinesterase, zeigen dagegen die charakteristischsten

Tabelle 1.

	I	II	III	IV
R = — $CH_2CH_2N(C_2H_5)_3$. I R′ = — $CH_2CH_2N(C_2H_5)_2C_3H_7$. I				
	(306 I.S.)	(449 I.S.)	(302 I.S.)	(452 I.S.)
Empfindlichkeit gegenüber der Cholinesterasewirkung				
True-Cholinesterase	nicht hydrolysiert	nicht hydrolysiert	nicht hydrolysiert	nicht hydrolysiert
Pseudo-Cholinesterase*	nicht hydrolysiert	schwach hydrolysiert (etwa 5%)	schwach hydrolysiert (etwa 20%)	hydrolysiert (etwa 20%)
Cholinesterase-Hemmung				
True-Cholinesterase**	kein Inhibitor	kein Inhibitor	Inhibitor $pI_{50} = 5$	Inhibitor $pI_{50} = 6$
Pseudo-Cholinesterase**	Inhibitor $pI_{50} = 5$	Inhibitor $pI_{50} = 6$	kein Inhibitor	schwacher Inhibitor $pI_{50} = 2{,}2$
Experimente am mit Chloralose narkotisierten Hund unter künstl. Atmung				
Blutdruckwirkung	keine Wirkung (10 mg)	Hypotension ohne Bradykardie (10 mg)	Hypotension (1—2 mg) nicotinähnliche Hypertension (5—10 mg)	Hypotension u. Bradykardie (1—5 mg) tox. (10 mg)
Wirkung auf die Acetylcholin-Hypotension und Bradycardie	keine Wirkung	keine Wirkung oder schwache Sensibilisierung	Verlängerung u. Sensibilisierung (0,1—0,2 mg)	Verlängerung und stärkere Sensibilisierg. (0,1—0,2 mg)
Wirkung auf den Vagusreiz	keine Wirkung Paralyse (0,5—2 mg)	keine Wirkung (0,1—0,2 mg) Paralyse (0,5—2 mg)	leichte Verlängerung (0,1—0,5 mg) Paralyse (0,5—2 mg)	Verlängerung (0,1—0,5 mg)
Toxizität (mg/kg)				
Kaninchen i.v.	8 mg	15 mg	4 mg	6 mg
Ratte i.p.	20 mg	30 mg	10 mg	5 mg

* Hydrolyse von Benzylcholin = 100.

** pI_{50} = log. inv. der Konzentration des Produktes, welche eine 50%ige Hemmung der Enzymhydrolyse des Acetylcholins verursacht.

Eserineigenschaften. Sie verursachen eine muscarinähnliche Vergiftung, mit Hypotension, Bradykardie und Vergrößerung der Speichelsekretion, sie erhöhen in starkem Maße die Acetylcholinwirkung und steigern den herzdrosselnden Effekt, der nach Vagusreiz auftritt.

Die besondere Bedeutung, die der True-Cholinesterase bei der Regulierung des Mechanismus der Acetylcholinübertragung bei den motorischen Nervenfasern und der ganglionären Synapsis im vegetativen Nervensystem zukommt, ergibt sich deutlich aus dem, was wir wissen über ihre Verteilung in den verschiedenen Geweben und stimmt überein mit den Anschauungen von Mendel[28], Koelle u. Gilman[23] und Nachmansohn[29].

Die Tatsache, daß es möglich ist, hohe Dosen eines Inhibitors der Pseudo-Cholinesterase zu injizieren ohne parasympathische Reaktionen hervorzurufen, bestätigt verschiedene schon früher beschriebene Beobachtungen.

Mazur u. Bodansky[27] u. a.[18, 22] haben gezeigt, daß die Hemmung der Serum-Pseudo-Cholinesterase durch schwache Dosen von Di-isopropylfluorophosphat von keiner vagalen Reaktion begleitet ist. Analoge Beobachtungen wurden von anderen Autoren mit folgenden Verbindungen beschrieben: Dimethylcarbaminsäureester des (2-Oxy-5-phenylbenzyl)-trimethylammoniumbromides (Nu 683)[10, 13, 21], Hexaäthyltetraphosphat[21, 32] und Tetraäthylpyrophosphat[21].

Neben der physiologischen Wirkung, die einer Potenzierung des endogenen oder exogenen Acetylcholin zugeschrieben werden kann und folglich direkt in Beziehung steht mit einer Hemmung der Pseudo- oder True-Cholinesterase, weisen die studierten Phthal- und Terephthalsäureester Eigenschaften auf, welche auf einen vollständig anderen Mechanismus deuten.

Daß die Anticholinesterasen, wie speziell von Koelle u. Gilman[23] und Heymans[20] beobachtet, pharmakodynamische Wirkungen hervorrufen können, die mit den in vitro beobachteten Eigenschaften nichts zu tun haben, zeigt sich deutlich in den beschriebenen Versuchen.

Unter den von der Eserinwirkung unabhängigen Sekundärerscheinungen müssen die curarisierende Wirkung, die ganglienblockierende Wirkung und ein schwacher Antagonismus gegenüber Acetylcholin erwähnt werden.

Wie schon weiter oben bemerkt, gleichen die in dieser Arbeit beschriebenen aromatischen Dicarbonsäureester stark einer großen Gruppe synthetischer Curareverbindungen, welche 2 oder mehrere quaternäre Ammoniumfunktionen enthalten[4, 5].

Die ganglionäre Vagusreizlähmung wurde oft als Sekundäreffekt der Anticholinesterasesubstanzen beschrieben, aber die Untersuchungen von Koppanyi u. Karczmar[24] haben deutlich gezeigt, daß sie nicht mit der Enzym-Inhibitorwirkung zusammenhängt.

Die Synthese der Derivate 302 I.S und 306 I.S. wurde schon früher von Fusco, Chiavarelli, Palazzo u. Bovet veröffentlicht[16]. Die anderen Derivate wurden

auf analoge Weise von Dr. G. Palazzo, welchem wir herzlich danken, dargestellt. Ebenfalls freundlichst danken möchten wir Herrn Prof. R. Dohrn, Direktor des Zoologischen Institutes von Neapel, welcher uns die Torpedi geliefert hat.

Literatur.

[1] Adams, D. H., and R. H. S. Thompson: Biochemic. J. **42**, 170 (1948). — [2] Ammon, P.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1934). — [3] Augustinson, K. B., and D. Nachmansohn: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 98 (1949). — [4] Bovet, D.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 407 (1951). — Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino, V. G. Longo et R. Fusco: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 1 (1951). — [5] Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino et V. G. Longo: Rend. Ist. sup. sanità, Roma **12**, 81, 106 (1949). — [6] Bovet-Nitti, F.: Rend. Ist. sup. sanità, Roma **12**, 138 (1949). — [7] Burgen, A. S. V., C. A. Keele and D. Slome: J. of Pharmacol. **96**, 396 (1949). — [8] Burgen, A. S. V.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 185 (1949). — [9] Burgen, A. S. V.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 219 (1949). — [10] Caldeyro, R., et E. Garcia Austt: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 454 (1949). — [11] Dayrit, C., C. H. Manry and M. H. Seevers: J. of Pharmacol. **92**, 173 (1948). — [12] Engelhardt, E., u. O. Loewi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **150**, 1 (1930). — [13] Fernandez, A., et J. J. Vinoles: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 85 (1949). — [14] Fröhlich, A., u. P. Pick: Z. exper. Med. **11**, 89 (1920). — [15] Führer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 51, 81 (1918). — [16] Fusco, R., G. Palazzo, S. Chiavarelli et D. Bovet: Gazz. chim. ital. **78**, 511 (1948). — [17] Glock, G. E., and G. A. Mogey: Communication to the Brit. Pharmacol. Soc. 1948. — [18] Hawkins, R. D., and B. Mendel: Brit. J. Pharmacol. **2**, 173 (1947). — [19] Hawkins, R. D., and B. Mendel: Biochemic. J. **44**, 260 (1949). — [20] Heymans, C.: Bull. Acad. Méd. Belg. (6) **14**, 76, 383 (1949). — [21] Heymans, C., R. Verbeke et Z. Votava: Arch. internat. Pharmacodynamie **77**, 486 (1949). — [22] Koelle, G. B., and A. Gilman: J. of Pharmacol. **87**, 421 (1946). — [23] Koelle, G. B., and A. Gilman: Pharmacol. Rev. **1**, 166 (1949). — [24] Koppanyi, T., and A. G. Karczmar: J. of Pharmacol. **101**, 327 (1951). — [25] Loewi, O., u. E. Navratil: Pflügers Arch. **214**, 689 (1926). — [26] Matthes, K.: J. of Physiol. **70**, 338 (1930). — [27] Mazur, A., and O. Bodansky: J. of Biol. Chem. **163**, 261 (1946). — [28] Mendel, B., D. B. Mundell and H. Rudney: Biochemic. J. **37**, 473 (1943). — [29] Nachmansohn, D.: The Hormone (Academic Press Inc. New York) **2**, 515 (1950). — [30] Nachmansohn, D., et J. Lederer: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **21**, 89 (1939). — [31] Verbeke, R.: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 1 (1949). — [32] Verbeke, R., et Z. Votava: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 367 (1949). — [33] Zeller, E. A., et A. Bisseger: Helvet. chim. Acta **26**, 1619 (1943).

Dr. Daniel Bovet, Istituto Superiore di Sanità, Roma,
Viale Regina Margherita, 299.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 62—68 (1953).

Laboratoire de pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris.

Effets anticholinesterasiques et action sensibilisante sur l'acétylcholine de quelques curares de synthèse*.

Par

R. Hazard, J. Cheymol et E. Corteggiani.

Avec 3 figures.

(Eingegangen am 13. März 1953.)

Bovet (1946[2]), Halpern (1947[7]), Peterfalvi et Jequier (1948[14]) signalent l'action anticholinestérasique de certaines substances curarisantes de synthèse. Plus récemment Bovet (1949[3]), Heymans (1949[13]) montrent l'indépendance de ces effets curarisants et antidiastasiques.

Au cours de recherches sur des curares synthétisés au laboratoire, nous avons apprécié systématiquement le pouvoir anticholinesterasique sérique de ces corps[8, 9, 10], activité nettement marquée pour certains d'entre eux.

Sur les six premiers corps figurant au tableau: (*G. L* 105 — 106 — 110, homologues se rattachant à la pyridine), (*G. L* 205 — 206 — 210, dérivés de l'amide nicotinique), nous avons étendu cette étude enzymatique à la comparaison des effets sur la pseudocholinestérase (sérum humain) et à la cholinestérase (cerveau de Cobaye). Ce travail a été complété par la recherche d'une sensibilisation éventuelle vis-à-vis de trois effets caractéristiques de l'acétylcholine (hypotension chez le Chien chloralosé** et actions contracturantes sur le *rectus abdominis* de Grenouille et le muscle dorsal énervé de Sangsue).

Les résultats sont groupés dans le tableau:

A. Action anticholinestérasique.

Dans le tableau sont portées les activités antipseudocholinestérasiques obtenues par la méthode colorimétrique de Hall et Lucas[6], ***.

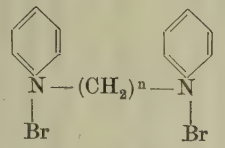
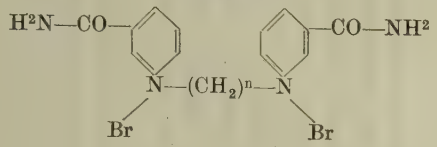
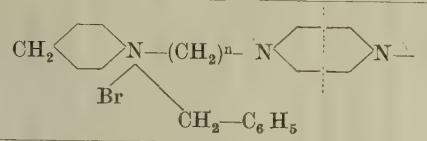
Cette technique n'étant pas applicable à l'étude de la cholinestérase vraie par suite de la coloration propre de la suspension cérébrale, l'activité des corps retenus a été appréciée à nouveau par la méthode de Warburg (technique d'Ammon[1]) sur les 2 cholinestérases.

---

* Dédié à Mr. le professeur Otto Loewi à l'occasion de son quatre-vingtième anniversaire.

** En 1947[5], nous avons montré que plusieurs curares naturels ou de synthèse sont capables de sensibiliser considérablement les effets de l'adrénaline ou de l'acétylcholine sur la pression artérielle du Chien chloralosé.

*** Pour les détails de technique v.[8–10].

Numéros conventionnels	Formules	Toxicité	Actions curarisantes		Action anticholinesterasique quantité en mg donnant une inhibition de 25 p. 100			Action sensibilisante		
		Souris mg p. kg	Lapin Chute tête mg. p. kg	Grenouille. Action anti-A/C. rectus μg	Technique de HALL et LUCAS (sérum humain)	Technique de WARBURG (sérum humain)	Technique de WARBURG (cerveau cobaye)	Rectus abdominis Grenouille	Muscle Sangsue	Pression artérielle Chien
										
G. L 105	n = 5	32	29	1 000	0,3	5	> 10	0	+	+
G. L 106	n = 6	26	22,5	1 400	0,01	0,05	10	0	+	++++
G. L 110	n = 10	15	10,5	300	0,001	0,005	0,001	++++	++++	++++
	d-tubocurarine	0,15	0,20	10	0,1	0,25	5			
										
G. L 205	n = 5	180	121	12 000	1	5	> 10	0	+	+
G. L 206	n = 6 (+2 OH_2)	80	78	3 000	0,5	1,5	> 10	++	++	+
G. L 210	n = 10	12	8	250	0,05	0,15	0,5	++++	++	+++
339 H. C		2,9	0,7	30	0,0001	0,001	0,4	0	+	++
	ésérine				0,00002	0,000005	0,00001	++++	++++ +++	+++ (toxique)

Activité antipseudocholinestérasique (sérum) et anticholinestérasique (cerveau) par la méthode de Warburg — (technique d'Ammon).

a) *Pseudocholinestérase.* — Le sérum humain est dilué au 1/20e dans le liquide de Ringer bicarbonaté à 2 p. 1000, 1 ml de la dilution est mis dans la fiole de l'appareil et 0,5 ml de solution neutralisée d'acétylcholine à 2 p. 100 dans la tubulure latérale — (pour la suite des manipulations voir plus bas).

b) *Cholinestérase du cerveau.* — Le cerveau de Cobaye est broyé dans un appareil de Potter[12] avec 5 fois son poids de liquide de Ringer bicarbonaté; l'émulsion cérébrale est diluée 6 fois.

1 ml de cette suspension (soit 0,033 g de cerveau) (quantité choisie pour obtenir une activité cholinestérasique du même ordre que celle donnée par $^1/_{20}$ ml de sérum humain) est placée dans la fiole de Warburg. 0,5 ml de solution neutralisée d'acétylcholine à 2 p. 100 sont versés dans la tubulure latérale du récipient.

Dans les 2 cas (température 38°, atmosphère N 95 V. — CO_2 5 V.), à partir du moment de la mise en contact de l'acétylcholine et de la diastase les lectures du dégagement de CO_2 sont faites toutes les dix minutes pendant une heure.

Parallèlement sont conduits les essais témoins ci-dessus et ceux comportant l'addition de substances inhibitrices au sérum ou à la suspension cérébrale (0,1 ml) à des concentrations nécessaires pour obtenir une diminution du dégagement de CO_2 de 25 p. 100.

La discussion portera uniquement sur les résultats donnés par cette dernière méthode sur les deux cholinestérases*.

L'examen du tableau montre:

Pseudocholinestérase: Ordre décroissant d'activité: *G. L* 110 — 106 — 210 — 105 — 206 — 205.

Cholinestérase: Ordre décroissant d'activité: *G. L* 110 — 210 — 106 ... les derniers sont inactifs.

Le *G. L* 110 se détache nettement des autres par son activité sur les deux cholinestérases**.

Le *G. L* 210 conserve une activité inhibitrice sur les 2 diastases bien qu'amoindrie par rapport au corps précédent.

Les autres, actifs sur la cholinestérase sérique, sont pratiquement inactifs sur la cholinestérase cérébrale. Notons même qu'à faible dose (inférieure à 10 mg) ils exaltent l'activité cholinestérasique cérébrale.

B. Actions sensibilisantes vis-à-vis de l'acétylcholine.

1. Action sur la pression artérielle du Chien chloralosé soumis à la respiration artificielle.

Le pouvoir sensibilisant à l'acétylcholine est apprécié de la façon suivante: une injection d'acétylcholine (1 μg à 5 μg p. kg) capable de provoquer une hypotension nette et constante est suivie d'injections de doses croissantes du curarisant

* Les indications fournies par la technique de Hall et Lucas et la technique de Warburg sur la cholinestérase sérique ne sont pas comparables les proportions d'enzyme et de substrat n'étant pas les mêmes *(v. tableau)*. Il nous a paru logique de comparer uniquement les résultats fournis pour les deux cholinestérases par une seule méthode.

** Rapport d'activité: $\frac{\text{ésérine}}{\text{GL 110}} = \frac{\overbrace{\text{Cholinestérases}}}{\underset{1000}{\text{sérique}} \qquad \underset{100}{\text{cérébrale}}}$

à essayer (0,1 à 20 mg p. kg). On évalue la sensibilisation entrainée par chacune de ces doses en réalisant par une quantité moindre d'acétylcholine une hypotension semblable à l'effet primitif. L'activité sensibilisante de chaque dose du produit essayé est donnée par le rapport des deux quantités d'acétylcholine provoquant la même chute tensionnelle.

Ces résultats sont schématisés dans le graphique 1, portant en abscisses les doses de curarisant et en ordonnées le coefficient de sensibilisation.

Ils amènent les conclusions suivantes: — l'ésérine est nettement plus active que les corps étudiés*, — l'ordre de sensibilisation décroissant est le suivant: *G. L* 110 — 106 — 210 — 105 — 206 — 205, ordre différent de celui du classement par effets curarisants. Cependant, ces corps classés selon leurs activités dans chacune des deux séries (*G. L* 100 et *G. L* 200) montrent un certain parallélisme entre les effets curarisants et les pouvoirs sensibilisants à l'hypotension acétylcholinique. Effets allant de pair avec l'éloignement progressif des deux ammoniums quaternaires[10].

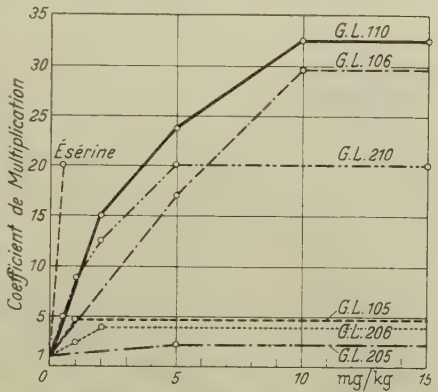


Fig. 1. Variation de l'activité de l'acétylcholine sur la pression artérielle du chien.

La sensibilisation de chaque produit sur l'hypotension acétylcholinique présente deux caractéristiques (v. fig. 1):

1. la pente de la courbe représentative du phénomène,
2. la dose pour laquelle ce phénomène est maximum, une augmentation des doses n'élevant plus cette sensibilisation.

*2. Action sur le rectus abdominis de Grenouille***.*

Sur ce test, les six substances étudiées sont curarisantes, mais trois d'entre elles (*G. L* 210 — 206 — 110) sensibilisent la préparation à l'action contracturante de l'acétylcholine dans un premier temps et à faibles doses.

Les résultats sont schématisés dans le graphique 2.

En abscisses sont portées les doses en μg ajoutées au bain (10 ml) contenant l'organe, en ordonnées les coefficients des variations d'activité de l'acétylcholine sur le muscle.

---

* La toxicité de l'ésérine ne permet pas l'essai de doses supérieures à 0,5 mg p. kg.

** Pour la technique voir[4].

Nous étudierons successivement les deux phénomènes:

a) Sensibilisation.

Une dose d'acétylcholine (10 à 20 μg) entraine une contraction submaximale du *rectus*. Après lavage et retour au tonus normal puis addition de doses progressives du curarisant étudié (1 à 100 μg), on constate chaque fois qu'une dose moindre d'acétylcholine (obtenue par tâtonnements) est susceptible de reproduire la contraction initiale. L'activité sensibilisante de chaque dose du produit essayé est donnée en divisant la première dose d'acétylcholine par la seconde.

L'examen du tableau montre les variations suivantes d'activité de l'acétylcholine:

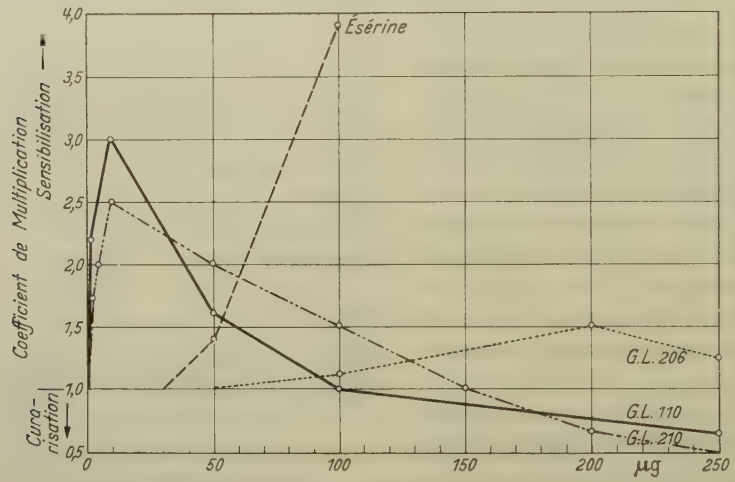


Fig. 2. Variation de l'activité de l'acétylcholine sur le muscle rectus abdominis de grenouille.

Le *G. L* 110 est plus actif aux faibles doses que l'ésérine mais le maximum est très vite atteint (10 μg), tandis que l'activité de l'ésérine continue à croître jusqu'à 100 μg, doses à partir desquelles elle devient elle même contracturante.

Les maxima de sensibilisation à l'acétylcholine sont atteints par des doses allant de: 10 μg (*G. L* 110 et 210) à 200 μg (*G. L* 206).

b) Curarisation.

Les pouvoirs curarisants sur le *rectus abdominis* pour les six substances retenues sont classés par ordre croissant:

G. L 205 ..... 12 mg, — 106 ..... 1,4 mg, — 110 ..... 0,3 mg,
— 206 ..... 3 mg, — 105 ..... 1 mg, — 210 ..... 0,25 mg.

Sur le graphique 2 les courbes d'activité des différents produits coupent la ligne d'abscisses en un point où les effets sensibilisant et curarisant s'annulent, l'action de l'acétylcholine sur le *rectus* étant semblable à la contraction initiale, ces points se situent pour deux de ces corps (*G. L* 210 et 110) entre 100 et 150 μg.

Pour le *G. L* 210 se trouve également porté sur le graphique 2 le point correspondant à une diminution de 50 p. 100 de la contraction acétylcholinique par curarisation (250 μg).

3. Sensibilisation du muscle de Sangsue à l'acétylcholine.

Tous les corps essayés agissent sur ce test, mais à des doses très différentes, les trois plus actifs sont *G. L* 206, 210 et 110. Le graphique 3 réunit leurs effets sensibilisants ainsi que ceux de l'ésérine correspondant à une même expérience.

L'ésérine est de beaucoup la plus active, puis le *G. L* 110 et nettement plus loin les *G. L* 210 et 206.

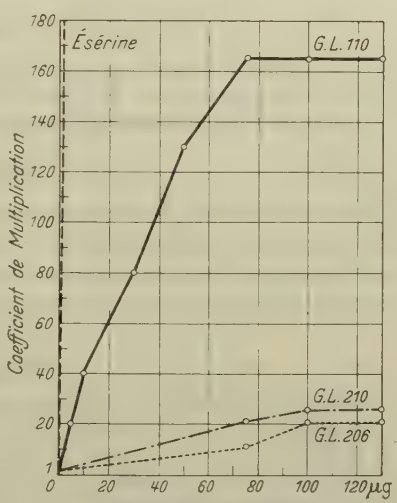


Fig. 3. Variation de l'activité de l'acétylcholine sur le muscle dorsal de sangsue.

Discussion.

Un corps, le *G. L* 110 tranche parmi les autres par son activité sur l'ensemble des différents tests, qu'il s'agisse d'effets curarisants (atonie musculaire, action anti-acétylcholinique sur le rectus) ou d'actions anticholinestérasiques ou sensibilisantes*.

Pour toutes les autres substances ce parallélisme disparaît.

Voici quelques exemples où l'action curarisante persiste à doses plus ou moins élevées, les effets sur les autres tests étant variables.

1. *Le G. L* 210 légèrement plus curarisant que le précédent est moins actif que lui dans toutes les autres expériences, par exemple: 30 à 50 fois moins dans le cas de la pseudocholinestérase, 500 fois moins pour la cholinestérase vraie.

2. Le *G. L* 206 pour lequel seules persistent les sensibilisations sur le *rectus* de Grenouille et le muscle de Sangsue, alors que l'action sensibilisante sur l'hypotension acétylcholinique est fortement diminuée.

3. Le *G. L* 106 pour lequel seules subsistent inversement l'activité sur la cholinestérase sérique alors que la sensibilisation est très nette sur l'hypotension acétylcholinique**.

---

* Le G. L 110 se rapproche par ses actions anticholinestérasiques et sensibilisantes à l'acétylcholine des effets de l'ésérine sans préjuger d'une liaison absolue entre ces deux effets[8].

** Signalons également pour deux substances de la même série G. L 102 et 203 des effets dissemblables sur ces tests[10]: G. L 102 non curarisant sur le rectus a une activité notable sur la cholinestérase sérique. — G. L 203 très curarisant sur le rectus est dépourvu pratiquement d'activité pseudocholinestérasique.

Dans un article actuellement sous presse sur des curarisants de synthèse préparés au laboratoire[9] se trouvent des tableaux dont nous extrayons quelques résultats venant à l'appui des considérations précédentes.

	Action curarisante chute tête Lapin mg/kg	Action anticholinestérasique. 25% mg
d-tubocurarine	0,2	0,1
336 H. C	2,8	0,025
339 H. C	2,5	0,0001*
340 H. C	2,1	0,001
343 H. C	2,4	0,002

Les chiffres donnés pour les 2 actions montrent une absence de parallélisme évidente, les curares H. C sont beaucoup plus anticholinestérasiques que la *d*-tubocurarine alors qu'ils sont moins curarisants que cet alcaloïde.

Conclusions.

Les exemples fournis ci-avant, empruntés à nos expériences, apportent une contribution à la dissociation nette dans une même substance entre les trois groupes d'actions envisagées: curarisante, anticholinestérasique et sensibilisante aux différentes actions de l'acétylcholine.

Bibliographie.

[1] Ammon, R., et Voss, G.: Pflügers Arch. **235**, 393 (1935). — [2] Bovet, D., S. Courvoisier, R. Ducrot, et R. Horclois, C. r. Acad. Sci., Paris **223**, 597 (1946). — [3] Bovet, D., S. Courvoisier, R. Ducrot et R. Horclois: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 137 (1949). — [4] Cheymol, J., et E. Corteggiani.: Ann. pharmaceut. Françaises **7**, 368 (1949). — [5] Cheymol, J., et E. Corteggiani.: Anesthésie et Analgésie, Paris **8**, 734 (1951). — [6] Hall, G. E., et C. C. Lucas: J. of Pharmacol. **59**, 34 (1937). — [7] Halpern, B. N., P. Benda et G. Bourdon: C. R. Soc. Biol. Paris **141**, 979 (1947). — [8] Hazard, R., J. Cheymol, P. Chabrier, E. Corteggiani et F. Nicolas: Arch. internat. Pharmacodynamie **84**, 237 (1950). — [9] Hazard, R., J. Cheymol, S. Chabrier, E. Corteggiani, et Y. Gay: Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 1 (1953). — [10] Hazard, R., J. Cheymol, J. A. Gautier, E. Corteggiani, et E. Leroi: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 271 (1952). — [11] Hazard, R., et E. Corteggiani: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 257 (1952). — [12] Hazard, R., et J. Delga.: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 116 (1952). — [13] Heymans, C., et Van den Heuvel: Experientia **5**, 213 (1949). — [14] Peterfalvi, M., et R. Jequier: C. R. Soc. Biol. Paris **142**, 179 (1948).

* Cette action n'est que 4 fois plus faible que celle de l'ésérine bien que les effets sensibilisants à l'acétylcholine sur les différents tests soient peu ou pas marqués *(v. tableau)*.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 69—82 (1953).

Med. Univ.-Klinik Malmö/Lund, Schweden.

ACTH und Cortisonwirkung bei Morbus Addison zugleich eine Hypothese zur Erklärung der Adrenalinprobe der eosinophilen Zellen im Blute*.

Von

JAN WALDENSTRÖM.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

Die Literatur der letzten Jahre enthält eine fast unübersehbare Fülle von Beobachtungen über die therapeutische Wirkung von Adrenocorticotropin (ACTH) und Cortison bei den verschiedensten Krankheiten. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um einen sozusagen *unspezifischen* Effekt, der vielleicht am besten als antiphlogistisch bezeichnet werden kann.

Rein endokrinologisch gesehen haben aber diese Substanzen eine *spezifische* Wirkung, die auch klinisch bedeutsam erscheint. Mit ACTH kann man den Funktionszustand der Nebennierenrinde (NNR) prüfen. Es wird auch behauptet, daß die Zufuhr von Adrenalin eine Sekretion von ACTH aus dem Vorderlappen der Hypophyse bewirkt und deshalb eine Prüfung des gesamten hypophysär-adrenalen Systems erlaubt. Endlich muß das Cortison natürlich bei geschädigter Nebennierenfunktion für die Substitution bedeutsam sein. Diese Mitteilung soll über einige klinische Beobachtungen auf diesem Gebiet berichten.

Der Einfluß von ACTH auf die vielfältigen Funktionen der NNR kann mit verschiedenen Methoden studiert werden. In der Klinik hat sich diese sogenannte ACTH-Probe in der Form eingebürgert, daß man die absolute Zahl der eosinophilen Zellen im Blut 4 Std nach Zufuhr von einer gewissen Menge von ACTH (25 mgm) bestimmt. Die normale Senkung soll nach THORN u. a. mindestens 50% des Ausgangswertes betragen. Der Effekt wird bei nebennierenlosen Tieren und Menschen und bei Kranken mit Morbus Addison nicht beobachtet. Die sogenannten Glucocorticoide bewirken aber eine Senkung auch bei diesen Kranken (THORN u. Mitarb.). Es kann damit als bewiesen betrachtet werden, daß ACTH die Senkung der eosinophilen Zellen im Blute durch Vermittlung der sogenannten Zuckerhormone der NNR bewirkt.

THORN hat weiter die Frage studiert, warum Adrenalin auch eine Senkung der eosinophilen Zellen hervorruft.

Wir haben in der Klinik in den letzten Jahren uns viel mit der Frage der Brauchbarkeit dieser Proben mit ACTH und Adrenalin befaßt und allmählich eine ziemliche Erfahrung damit gesammelt. Mit ACTH haben wir nahezu 500 Proben ausgeführt, mit Adrenalin 116 Proben.

* Herrn Prof. LOEWI zum 80. Geburtstag gewidmet.

Vor allem ist natürlich das Problem von Interesse, wie sich Kranke mit Zeichen der NNR-Insufizienz verhalten. Deshalb haben wir versucht, alle klaren Fälle von Addison zu prüfen. Dazu gibt es ein großes Material von Fällen mit Pigmentierungen und mit Hypotonie, die einem Addison ähnlich sind, aber sonst keine Symptome haben, die auf Addison verdächtig sind. Diese Krankengeschichten werden später näher analysiert werden.

Unser klinisches Material von Kranken mit unzweifelhaftem Morbus Addison umfaßt acht endokrinologisch näher analysierte Fälle. In den letzten Jahren ist es immer deutlicher geworden, daß die funktionellen Proben der NNR-Funktion mit ACTH von der größten diagnostischen Bedeutung bei dieser Krankheit sind. Sämtliche Kranke mit verdächtiger NNR-Insuffizienz sind deshalb damit geprüft worden. Einerseits haben wir dabei die indirekte Probe nach Thorn in verbesserter Form ausgeführt, wobei die eosinophilen Zellen im Blut vor und nach einmaliger Zufuhr von ACTH (20 mgm) nach 2, 3, 4, 6 Std gezählt werden. Die verwendete Methode ist eine Modifikation der von Rud eingeführten, die in unserem Labor sehr gute und zuverlässige Werte gegeben hat. Es hat sich gezeigt (Waldenström 1950), daß der von Thorn bestimmte 4-Stundenwert nach der Injektion keine sicheren Schlüsse auf das wahre Reaktionsvermögen der NNR zuläßt. Nur durch die mehrmalige Auszählung nach der Injektion kann man einen wirklichen Überblick über die Antwort der eosinophilen Zellen im Blut erhalten und den wahren maximalen Effekt nachweisen. Andererseits ist eine indirekte Methode, mit der man durch ACTH die Hormone aus der NNR erst mobilisiert und dann sekundär ihren Effekt auf die eosinophilen Blutzellen nachweist, durch direktere Messerungen der vermehrten Hormonproduktion zu ergänzen. Dies kann durch quantitative Bestimmung ihrer Endprodukte im Harn geschehen.

Die androgene Fraktion im Harn wird offenbar recht gut durch die sogenannten 17-ketosteroide ausgedrückt. Normal steigen sie nach ACTH-Gaben während z. B. drei aufeinanderfolgender Tage stark an. Normales Ansteigen spricht offenbar dafür, daß die NNR reaktionsfähig ist. Dasselbe gilt für die Zunahme der sogenannten 11-oxysteroidfraktion im Harne, die als Abbauprodukt der Zuckerhormone (Glykocorticoide) der NNR zu betrachten ist. Diese Hormonfraktion bewirkt, wie oben erwähnt, auch die Senkung der eosinophilen Zellen im Blute.

Von Thorn wurde behauptet, daß man nach *Adrenalingabe* eine Senkung der eosinophilen Zellen im Blut sieht, die dadurch bedingt sein sollte, daß Adrenalin auf hypothalamische Zentren wirkt und dadurch ACTH aus der Hypophyse mobilisiert, das dann die NNR zur Produktion von Glykocorticoiden anregt, wodurch sekundär die eosinophilen Zellen im Blut vermindert werden. Diese Auffassung wurde aus vielen Gründen kritisiert. Thorn selbst hatte gefunden, daß zwar bei Kranken mit Addison die ACTH-Probe negativ ist, daß Adrenalin manchmal doch eine Wirkung

ausübt. Er glaubte dies durch Verminderung der Dosis des Adrenalins verhindern zu können und war später der Ansicht, daß mit einer Dose von nur 0,3 mgm keine Wirkung beim Addisonkranken zu sehen wäre (Recant u. a.). Von Waldenström wurde (1950) nachgewiesen, daß auch kleine Dosen von Adrenalin bei sicherem Addison einen Effekt haben können. Dasselbe wurde auch in einem Falle mit Myxödem gefunden, wo die Antwort auf ACTH schlecht war bei guter Ansprechbarkeit auf Adrenalin. Diese Tatsachen konnten damals nicht erklärt werden.

Eine Reihe von Autoren und neulich Best, Muehrke und Kark haben dann das Problem weiter studiert. Publikationen von Kark und Muehrke (1952) sowie von Muehrke im selben Jahr zeigen, daß nach Exstirpation der NN bei Kranken mit Prostatacarcinom der Eosinophilentest immer noch positiv sein kann, auch wenn ACTH keine Wirkung mehr zeigt. Diese Kranken waren alle mit Cortison behandelt. Robinson soll laut mündlicher Mitteilung (Kark u. a.) auch bei einem mit Cortison behandelten Addisonkranken eine gute Antwort auf Adrenalin gesehen

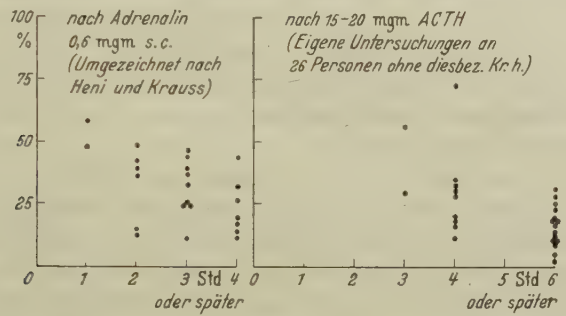


Abb. 1. Eintritt der maximalen Senkung der eosinophilen Zellen in Prozent des Ausgangswertes.

haben. Die Autoren stellen fest, daß Cortison offenbar für die Wirkung des Adrenalins notwendig ist und prüfen, ob man nach Zusatz von Adrenalin und Cortison direkt zum Blut eine Eosinopenie erzielen kann. Die Autoren diskutieren auch die Hypothese, daß Adrenalin evtl. durch Einwirkung auf irgend ein Organ, z. B. die Lunge, in Anwesenheit von Cortison eine Zerstörung der eosinophilen Zellen begünstigt.

Eine Reihe von weiteren Autoren (Ruppel, Lohmeyer und Hüsselman u. a.) haben in letzter Zeit die Unzuverlässigkeit der Adrenalinprobe als Test der NNR-Funktion nachgewiesen.

Wir haben aus der Arbeit von Heni und Krauss die bei verschiedenen normalen Personen gefundenen Minimalwerte nach Adrenalingabe graphisch dargestellt (Abb. 1). Es zeigte sich dabei, daß nur bei einer Versuchsperson von 24 untersuchten die eosinophilen Zellen nicht die normale Mindestsenkung von 50% erreicht haben. Sonst sieht man deutlich die Tatsache, daß zweimal der Minimalwert schon nach 1 Std eintritt, 6mal nach 2 Std, 9mal nach 3 Std und nur 7mal nach 4 Std oder später. Nach unserer eigenen Erfahrung mit ACTH-Test bei 26 Kranken, die keine Zeichen eines Leidens zeigen, die den Test beeinflussen könnte, sieht man dagegen nach ACTH den Minimalwert mit nur zwei Ausnahmen in der 4. oder 6. Std (rechte Hälfte desselben Bildes). Es ist also wahrscheinlich, daß der maximale Effekt der Adrenalinwirkung schneller

eintritt als der der ACTH-Wirkung, was schwer damit zu vereinbaren ist, daß die Erstere nur mittelbar durch ACTH-Ausschwemmung zustande kommt. Natürlich gibt es mehrere denkbare Erklärungsmöglichkeiten, z. B. daß die kräftigere Wirkung des ACTH eine Verspätung der Maximalwirkung hervorruft. Andererseits ist wohl schwer verständlich, daß der Effekt der Reaktionskette Adrenalin-Hypothalamus-Vorderlappen-ACTH-NNR-Corticoidbildung-Eosinophilensenkung schneller verlaufen sollte als die letzten vier Glieder dieser Kette allein. Daß Resorptionsfaktoren dabei von Bedeutung sein sollten, scheint mir wenig wahrscheinlich.

Um den Effekt von ACTH und von Adrenalin zu vergleichen, haben wir bei einer großen Zahl von Personen den Ausfall der Adrenalintests und den der ACTH-Tests verglichen. Die Zahl der Normalpersonen war dabei ziemlich klein (s. oben), hauptsächlich handelte es sich um Kranke mit den verschiedensten endokrinen, allergischen und „rheumatischen" Affektionen. In diesem Zusammenhange sollen nur die Ergebnisse bei unseren 8 Addisonkranken berücksichtigt werden, da hier die Verhältnisse am übersichtlichsten sind.

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, wie zuverlässig die ACTH-Probe offenbar für die Diagnose des Morbus Addison ist. Bei einer Kranken (M. B. R.) sahen wir einen einzigen Wert unterhalb 50%, der natürlich auch auf einem technischen Fehler beruhen kann. Sonst waren die Werte (mit Ausnahme der Kranken A. E., die unten besonders diskutiert wird) immer fast konstant.

Das Ergebnis der Adrenalinprobe ist ein anderes. Hier sieht man mehrmals ein gewisses Absinken der Werte und auch in einigen Fällen einen „positiven" Ausfall der Probe mit einer Senkung von mehr als 50%. Das Interessanteste scheint mir die Tatsache zu sein, daß *nach* eingeleiteter *Cortisonbehandlung* bei 3 Fällen ein *stärkerer Effekt des Adrenalins* notiert wurde *als vor* der Behandlung. Dies ist auch aus den Kurven (Abb. 3—5) zu ersehen. Natürlich ist das Material viel zu klein, um sichere Schlüsse zu erlauben. Andererseits ist es doch bemerkenswert, daß die Resultate dieselbe Tendenz zeigen.

Die Frage nach der Bedeutung der ACTH-Probe für die Diagnose der NNR-Insuffizienz ist natürlich eine sehr wichtige. Es ist schon von vielen Seiten nachgewiesen worden, daß auch andere Faktoren als eine herabgesetzte Funktion der NNR einen negativen Ausfall der ACTH-Probe bedingen können. Dies haben wir selbst mehrfach bestätigen können, z. B. bei hochgradiger Eosinophilie. Dabei ist natürlich auch die Adrenalinprobe negativ. Eine negative Probe mit ACTH kann also nur unter Rücksicht auf andere Faktoren für die Diagnose NNR-Insuffizienz benutzt werden. Man fragt sich aber, ob ein positiver Eosinophilentest mit ACTH die Diagnose Morbus Addison ausschließt. Früher haben wir immer die Auffassung gehabt, daß dies der Fall wäre. In letzter Zeit

Tabelle 1.

Name	Datum	ACTH mg	Adrenalin mg	Vor Inj. pro mm³ = 100%	Eosinophile Zellen im Blute Prozent des Ausgangswertes 2	3	4	6	8	11 Std n. Inj.	
M. B. R. ♀	25. 2.50	20		381	125	121	*112*	115			
geb. 22	17. 5.50		0,5	424	103	63	*57*	88			
	25. 5.50		0,3	719	83	49	*44*	48			
	23.11.50		0,3	1213	75	*60*	85	103			
	24.11.50	20		1275	*74*	85	90	83			vor Cortison
	28. 3.51	20		765	*47*	53	84	67			n. Cortison
	30. 7.52	20	Retard	426	81	81	*69*	108	125		107
T. T. ♂	12. 4.50	20		81	*100*	116	130	123			
geb. 99	11.12.50		0,3	119	74	*57*	*47*	53			
E. T. ♂	5. 5.50	20		206	131	*82*	97	128			
geb. 14	10. 5.50		0,3	281	118	*58*	73	76			
G. N. ♂	22.12.50	20		588	82	*67*	93	96			
geb. 16	28.12.50		0,5	894	65	*24*	57	45			
	15. 1.52	20		585	88	77	110	*66*			
B. N. ♂	16. 1.52	20		513	99	104	*97*	100			
geb. 25	23. 1.52		0,3	447	101	*90*	100	96			vor Cortison
	7. 8.52	20		346	87	87	*83*	101	87		n. Cortison
	11. 8.52	20	Retard	288	102	*99*	110	102	113		134
	19. 9.52		0,3	596	53	*35*	44	59	86		
	22. 9.52	20		550	79	93	*77*	118	88		
								Inj.	7 h.		9 h.
	27. 3.53		0,3 + 0,3	402	65	63	56	74	101		*39*
H. L. ♂	28. 1.52		0,3	509	87	87	*75*	101			
geb. 18	30. 1.52	20		566	*73*	93	90	130			vor Cortison
	7. 8.52	20		358	94	86	*52*	75	74		n. Cortison
	11. 8.52	20	Retard	663	99	74	96	*73*	78		86
A. S. ♂	7. 2.52		0,3	725	72	*44*	54	46	54		
geb. 93	8. 2.52	20		550	81	77	*64*	73			vor Cortison
	28. 7.52	20	Retard	668	107	92	116	*42*	55		67 n. C.
	1. 8.52	20		820	103	*73*	93	88	75		
								Inj.			9 h. 10 h.
	9.10.52		0,3 + 0,3	519	80	67	*48*	71	99		49 78
A. E. ♀	4.12.52	20		338	92	73	62	*55*	88		
geb. 20	9.12.52		0,3	363	52	*24*	28	43	51		
	22.12.52	20		419	103	75	77	*30*	62		
	15. 1.53	20		466	105	68	*52*	66	77		

haben wir aber unsere Auffassung revidieren müssen, da wir eine Kranke beobachtet haben, die das folgende Krankheitsbild zeigt.

Frau A. E., geb. 1920. 1941 tuberkulöse Pleuritis, 1947—1948 tuberkulöse Cervicalspondylitis mit Senkungsabsceß, operiert nach ALBEE. Im Frühling 1952 schwach, dyspnoisch mit allmählich zunehmender Müdigkeit. Seit 2 Jahren zunehmende Pigmentierung der Haut. Hat 4 kg abgenommen und leidet zeitweise an Erbrechen. Aufgenommen am 1. 12. 1952. Afebril. Mager. Blaue Augen. Die ganze Haut ist stark pigmentiert, besonders um die Augen, an Ellenbogen, Dorsalseiten der Hände und Areolae Mammae. Deutliche Linea fusca. Bedeutende Hypotonie, konstant 110/80—95. Nach Abführmittel Verschlechterung mit Erbrechen und drohendem Kollaps. Nüchternblutzucker normal. Zukkerbelastung maximal 0,15. Insulinbelastung minimal 0,05. Persistierende Senkung um 50 mm herum. Elektrolytwerte im Blut normal. Resultate der Hormonuntersuchungen siehe Tabelle. Diese Kranke hat klinisch einen sicheren Morbus Addison, der wohl mit Hinblick auf die früheren tuberkulösen Prozesse mutmaßlich tuberkulös ist. Mit DOCA und Kochsalz gute Besserung des Allgemeinzustandes. Gewichtszunahme von 2,5 kg in den ersten 3 Tagen, danach ungefähr konstantes Gewicht. Die Tab. 1 zeigt, wie die ACTH-Injektionen trotzdem einen deutlichen Effekt auf die eosinophilen Zellen haben. Zwar ist nur eine Probe positiv nach den THORNschen Kriterien (> 50% Senkung), aber auch die minimalen Werte in den anderen 2 Proben sind niedriger, als man es sonst beim Addison sieht. Nach meiner Meinung ist es also deutlich, daß ACTH hier eine gewisse Mobilisierung der NNR-Funktion hervorruft. Es ist interessant zu sehen, daß der Eosinophilentest nach Adrenalin in diesem Falle sogar stark positiv ist. Dies würde also gut mit der allgemeinen Tendenz übereinstimmen, daß beim Addison die Adrenalinprobe stärker positiv ausfällt als die ACTH-Probe. Die 17-ketosteroidfraktion zeigt bei zwei verschiedenen Bestimmungen Werte von 1,6 mgm 24 Std, und 2,3 mgm/24 Std. Normalwerte für eine Frau in ihrem Alter 6 mgm nach HAMBURGER. Die Oxysteroide waren 0,32 und 0,34 mgm/24 Std. Normal nach SPRECHLER 0,7 mgm/24 Std für Frauen in ihrem Alter. Nach drei Tagen ACTH kein Anstieg (0,24 mgm/24 Std) bei zwei Gelegenheiten.

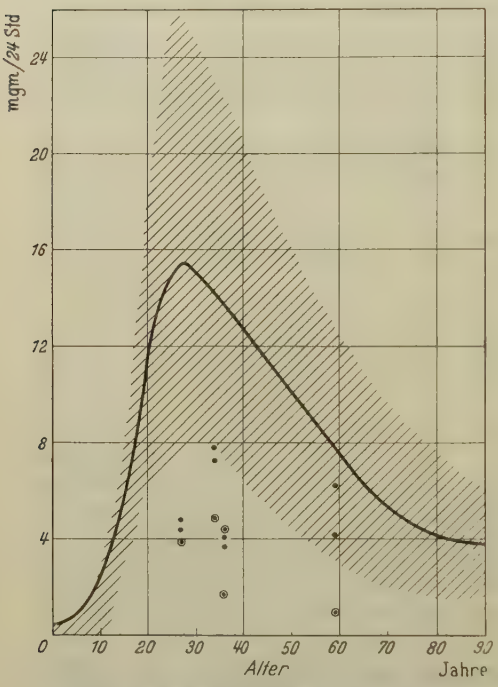


Abb. 2. Mittelwerte der 17-Ketosteroidausscheidung im Harn bei gesunden Männern im verschiedenen Alter ∓ 20 nach HAMBURGER. Eingezeichnete Befunde bei vier Kranken mit Addison. Vor ACTH •, nach dreitägiger ACTH-Gabe ⊙. Keine Zunahme, meistens niedrige Werte.

Es ist also deutlich, daß nach diesen Kriterien ihre NNR subnormal funktioniert.

Durch Untersuchungen von vielen Forschern (z. B. Luft 1943) ist es jetzt sichergestellt, daß auch die 17-ketosteroidfraktion im Harne besonders bei Frauen beim Addison stark herabgesetzt ist. Besonders wichtig erschien uns die Frage, ob eine Antwort nach ACTH zu finden wäre. Es wurden deshalb bei 4 Männern die 17-ketosteroide im Harn nach 3tägiger Gabe von ACTH (20—40—40 mg) bestimmt. Die Werte bei den männlichen Kranken gehen aus der Abb. 2 hervor. Es ist ohne weiteres ersichtlich, daß keine Erhöhung der Werte zu sehen ist. Im Gegenteil, sind die Werte *nach* ACTH-Gabe (mit einer Ausnahme) niedriger als vorher, was vielleicht durch einen Zufall bedingt ist. Diese Untersuchungen wurden von Skanse und mir besonders deshalb ausgeführt, weil wir wissen möchten, inwieweit das Androgen produzierende Gewebe in den Testes durch ACTH angeregt wird. Dieses Problem wird in anderem Zusammenhange aufgenommen werden. Hier werden diese Tatsachen hauptsächlich als Beweis für die Korrektheit der Addisondiagnose angeführt. Es fragt sich nun, wie die oben erwähnte Kranke, die auf ACTH mit Eosinophilensenkung antwortet, in Bezug auf 17-ketosteroiden reagiert. Ihre Werte ohne Test sind sicher pathologisch herabgesetzt (1,6 und 2,3 mg pro 24 Std). Nach 3tägiger ACTH-Behandlung stiegen sie nur bis auf 4,1 mg pro 24 Std, was ein niedriger Normalwert ist und sicher eine verminderte Ansprechbarkeit der NNR bedeutet, da Normalpersonen einen weit höheren Anstieg zeigen. Bei den Oxysteroiden wurde überhaupt keine Wirkung gefunden (s. Krankengeschichte).

Diskussion. Zur Frage: Adrenalinwirkung und Nebennierenrinde.

Die Erkenntnis, daß ein akuter Stress eine Adrenalinausschüttung aus dem *Mark* bewirkt, ist seit den klassischen Versuchen von Cannon und Rosenblüth zu einer wichtigen physiologischen und klinischen Tatsache geworden. In den letzten Jahren ist dann die *Rinde* der Nebenniere in das Zentrum des Interesses gerückt und man hat sich hauptsächlich mit der Bedeutung des Systems ACTH—NNR beschäftigt. Es wurde dabei versucht, die Zusammenhänge so zu erklären, daß vom NN-Mark sezerniertes Adrenalin in der Hypophyse vorhandenes ACTH ausschwemmt und dadurch sekundär eine Mobilisierung der NNR-Hormone hervorruft. Dies scheint wohl eine sehr akzeptable Hypothese zu sein, da wir doch durch die schönen Untersuchungen von Markee et al. wissen, daß Adrenalin lokal im Hypothalamus eingebracht Gonadotropinausschüttung aus der Hypophyse bewirkt. Die durch Coitus hervorgerufene Ovulation beim Kaninchen kann durch Procain im Hypothalamus (Westman u. Jacobson) sowie durch Blockierung mit antiadrenergischen Substanzen aufgehoben werden (Markee, Everett u. a.). Die Analogie mit der theoretisch postulierten Kette: Adrenalin-Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-NNR ist offensichtlich. Die sicheren ex-

perimentellen Beweise für eine durch Adrenalin bedingte ACTH-Abgabe aus der Hypophyse fehlen bis jetzt (s. aber M. Vogt).

Es wurden im vorhergehenden eine Reihe von klinischen Tatsachen dargestellt, die zu dieser Theorie eigentlich nicht gut passen. Deshalb scheint es nötig, eine bessere Hypothese aufzustellen, um womöglich die bekannten Tatsachen zu erklären.

Nach meiner Meinung würde folgende Hypothese die meisten oder vielleicht alle Ergebnisse, die mit dem Eosinophiltest nach Adrenalin gewonnen wurden, erklären.

Das Adrenalin wirkt nicht mittelbar durch Stimulierung der ACTH-Abgabe aus der Hypophyse. Seine Wirkung besteht vielmehr darin, daß die Abgabe von fertiggebildeten Corticosteroiden direkt aus den Depots ausgelöst wird. Dadurch kann man eine Reihe von Tatsachen erklären, die im folgenden ausgeführt werden.

1. Die maximale Wirkung von Adrenalin scheint schneller einzutreten mit dem maximalen Effekt etwa nach 3 Std im Gegensatz zu der ACTH-Wirkung, die ein späteres Maximum und einen mehr langdauernden Effekt zeigt. Dies wird in der Abb. 1 gut illustriert. Wenn das Adrenalin erst nach Ausschwemmung von ACTH aus der Hypophyse wirkt, würde man sich wohl eher einen späteren Eintritt der Wirkung vorstellen.

2. Die Tatsache, daß Adrenalin bei manchen Kranken mit klinisch sicherem Addison wirken kann, ist nach der Hypothese gut verständlich. Es ist wohl anzunehmen, daß Fälle von Addisonscher Krankheit keinen absoluten NNR-Schwund zeigen (vgl. hierzu Fall 8, A. E.). Vielmehr besteht wohl gewöhnlich immer noch eine gewisse Menge von fuktionierendem Parenchym, die sie am Leben halten, wenn keine äußere Einwirkung eine Krise hervorruft. Völlig ohne NNR kann ein Mensch wahrscheinlich nicht für längere Zeit am Leben bleiben. Wenn dies richtig ist, müßte die NNR imstande sein, kleine Mengen von Cortison zu produzieren, die dann auf Adrenalin mobilisiert werden könnten. Dagegen läßt sich eine neue Synthese in größerem Stil nach ACTH-Zufuhr bei diesen Kranken nicht mehr auslösen, was den schwachen Eosinophileneffekt bei der ACTH-Probe erklärt.

3. Es wird in der Literatur angegeben, daß Menschen, bei denen die NN total entfernt wurden und die danach mit Cortison behandelt wurden, nach Adrenalin mit Senkung der eosinophilen Zellen reagieren. (Muehrcke u. a.). Dies wäre durch die Hypothese der Mobilisierung zu erklären. Das zugeführte Cortison wird in irgendeiner Form aufgelagert, um bei Bedarf wieder verbraucht zu werden. Offenbar müssen in diesen Fällen andere Depotorgane als die NN angenommen werden.

4. Wir konnten bei 2 Kranken mit Addison, in 1 Falle sogar bei zwei verschiedenen Gelegenheiten, beobachten, wie die eosinophilen Zellen bei akuten Infektionen in normaler Weise heruntergingen. Von den

meisten Autoren, die diese Frage studiert haben, wird hingegen behauptet, daß die Reaktion der NN auf einen solchen Stress beim unbehandelten Addisonkranken zu schwach ist, um eine Eosinopenie hervorzurufen. In unseren Fällen waren die Kranken aber mit Cortison behandelt und es wäre wohl möglich, daß die Eosinopenie durch Ausschwemmung von abgelagerten Corticoiden zustande kommt.

5. Die nahe räumliche Beziehung zwischen NNR und NN-Mark. Bei einem akuten Stresszustande wird bekanntlich in der ersten Phase Adrenalin in großen Mengen ausgeschüttet. Es wäre wohl denkbar, daß eine direkte Einwirkung von dem im Mark produzierten Adrenalin auf die Rindenzellen eintreten könnte, was dann die schnelle Ausschwemmung von aufgelagerten Corticoiden bewirkt. Daß im Mark gewisse Vorräte von Corticoiden vorhanden sind, wissen wir ja schon. Es wurden ja bekanntlich die Hormone aus Nebennieren erstmals dargestellt. Wenn die Rinde und das Mark nicht irgendwie als funktionelle Einheit auftreten, ist es schwer verständlich, warum diese ganz verschieden angelegten Organe beim Embryo sich gegenseitig attrahieren und schließlich zusammenschmelzen. Ob dazu noch eine Abgabe von ACTH aus der Hypophyse in Frage kommt, ist noch nicht sicher bewiesen. Es lassen sich mit wiederholten Adrenalininjektionen keine therapeutischen Erfolge erzielen bei Krankheiten, die auf wiederholten ACTH-Gaben gut reagieren, was wohl am ehesten dafür spricht, daß keine wirkliche Mehrproduktion von ACTH zustande kommt. Es ist vielleicht in dieser Beziehung von einem gewissen Interesse, daß das Noradrenalin, daß nach neueren Untersuchungen normal offenbar extraadrenal zum großen Teil gebildet wird, nach den Untersuchungen von Luft und Euler keinen Einfluß auf die eosinophilen Zellen ausübt. Diese kommt, soviel wir jetzt wissen, nur dem in dem Nebennierenmark gebildeten Adrenalin zu.

Die Cortisonwirkung bei NNR-Insuffizienz.

Die therapeutische Bedeutung von Cortison bei der Addisonschen Krankheit wird immer mehr betont. Wir haben in den letzten Jahren eine gewisse Erfahrung damit sammeln können und konnten dabei unter anderem die Angabe von Thorn bestätigen, daß das Elektroenzephalogramm nach Cortisongabe weitgehend normalisiert wird, was dagegen mit DOCA-Therapie nicht zu erzielen ist. Zu gleicher Zeit findet man auch eine ganz auffällige Verbesserung der Leistungsfähigkeit dieser Kranken, die besonders bei geistig arbeitenden Leuten sehr deutlich ist. Wir sind deshalb der Überzeugung, daß das Cortison eine wichtige Bereicherung unseres therapeutischen Arsenals bei der NNR-Insuffiziens ist.

Bei einigen Kranken glauben wir die Beobachtung gemacht zu haben, daß Cortison ein anderes Symptom beim Addison vielleicht spezifisch

beeinflußt, nämlich das Körpergewicht. Es ist auffallend, daß die klinische Literatur über Morbus Addison so wenig Angaben über Magerkeit enthält. Andererseits ist natürlich die Dehydrierung mit daraus folgendem Gewichtsverlust eine natürliche Erklärung auch für die Gewichtsabnahme. In unserem Material von Addisonkranken war es aber auffallend, daß wir nur einen einzigen Fall beobachten konnten, bei dem eine wirkliche Fettleibigkeit bestand (Tab. 2). Dieser Mann hatte eigen-

Tabelle 2.

Name	Alter Jahre	Körperlänge cm	Max. Gewicht vor Cortison kg	Max. Gewicht nach Cortison kg
Männer				
B. N.	27	168	54,3	60,4
H. L.	34	175	57,8	65,5
G. N.	36	175	67	—
E. T.	36	169	57,7	—
T. S.	51	175	92	—
A. S.	59	176	76,5	78,5
Frauen				
M-B. R.	30	157,5	52	61,5
A. E.	32	160	47,5	—

artigerweise auch einen Diabetes, der mit kleinen Insulingaben gut beeinflußbar war. Leider konnte bei ihm keine Bestimmung der Oxysteroidfraktion gemacht werden. Sonst sind unsere sämtlichen Fälle mager gewesen.

Ich habe es versucht, in der Literatur Angaben über das Körpergewicht beim Addison zu finden. Thorn, der über ein sehr großes Krankengut mit dieser Krankheit verfügt, ist der Meinung, daß, wenn auch die Dehydrierung viel von dem Gewichtsverlust bei der Addisonschen Krankheit erklärt, viele Kranke jedoch nicht ihr Idealgewicht trotz voller Hydrierung erreichen. Es werden aber keine Daten hierüber gegeben und es fehlen, so viel ich weiß, Beobachtungen über Gewichtszunahme bei der Cortisontherapie.

Fünf von unseren Kranken mit Addison werden jetzt mit Cortison behandelt, offenbar mit sehr gutem Erfolg. In einem Falle wurde die Cortisonbehandlung schon vom Anfang an eingeleitet, so daß man nicht mehr sagen kann, wieviel von der Gewichtszunahme durch DOCA-bedingte Wasserretention bzw. durch Cortison bedingt ist. In 3 anderen Fällen (Abb. 3—5) sieht man an der Gewichtskurve, wie nach Zulage von Cortison eine weitere schnelle Zunahme des Gewichts auftritt. In 2 Fällen ist diese Änderung besonders deutlich zu sehen. In dem einen Falle ist das Gewicht nach einer bestimmten DOCA-Menge konstant geblieben, um dann auf Cortison mit 4,5 kg schnell anzusteigen. Die weitere Beobachtung während eines ganzen Jahres mit derselben Dosis von DOCA und Cortison hat ein konstantes Gewicht ergeben. Bei der anderen

Patientin war der Erfolg von DOCA noch stärker. Die Kranke war vor Anfang der Cortisontherapie im Januar 1951 auf ein konstantes Gewicht eingestellt. In Zusammenhang mit einer Krise hat sie dann plötzlich abgenommen. Diese Verluste wurden aber mit DOCA wieder kompensiert.

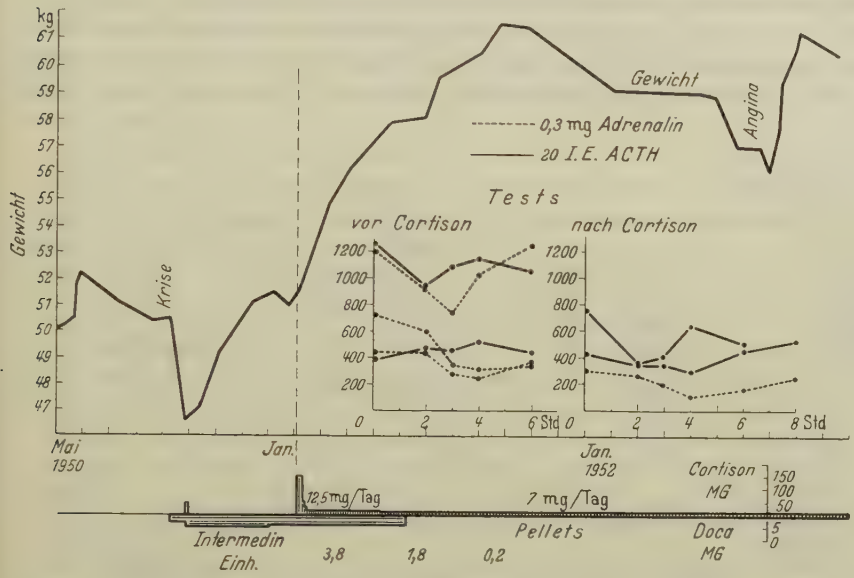


Abb. 3.

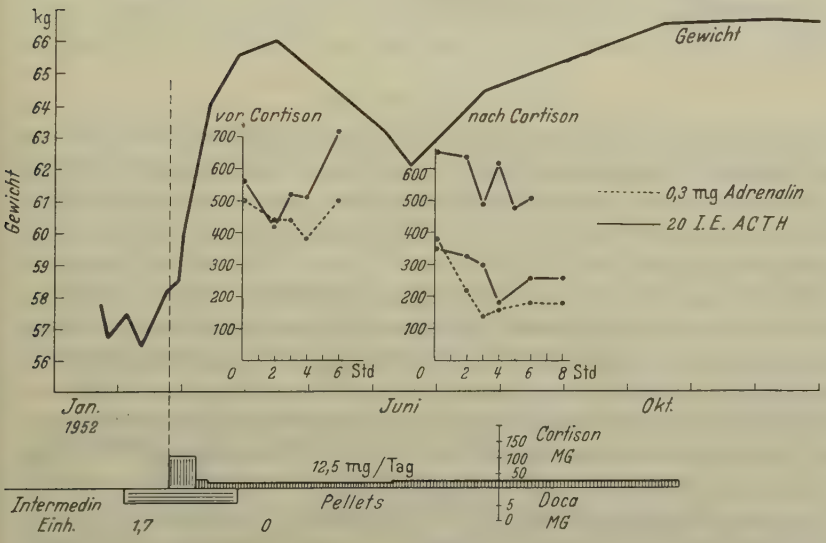


Abb. 4.

Abb. 3, 4, 5 zeigen den Einfluß der Hormonbehandlung bei drei Kranken mit mb. Addison (s. Text).

Zulage von Cortison im Februar 1951 gab dann weitere sehr gute Gewichtszunahme, so daß die Kranke jetzt mit 157 cm Körperlänge ein Gewicht von rund 60 kg zeigt. Ihre Arbeitsfähigkeit ist auch fast normal geworden.

Es wird ja gewöhnlich in der Literatur behauptet, daß Kranke mit Morbus Cushing fettleibig sind. Dies ist wohl nur zu einem gewissen Grade richtig, aber natürlich gehört stärkere Adipositas des Rumpfes mit zum Bilde. Wir wissen ja auch durch die allgemeine Verwendung von ACTH

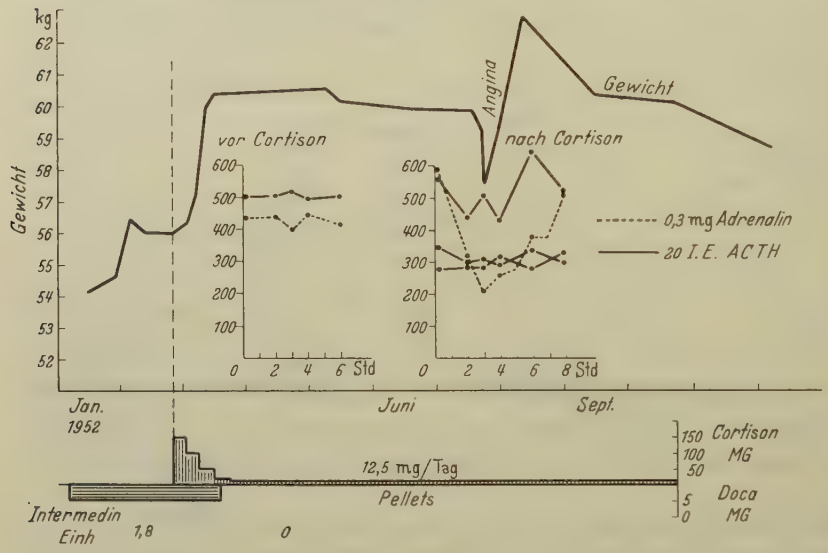


Abb. 5.

und Cortison in den letzten Jahren, daß das Vollmondgesicht oft als unerwünschte Nebenwirkung auftritt. Es wurde auch immer bemerkt, daß Morbus Cushing und Morbus Addison den Hyper- bzw. Hypofunktionszustand der NN vertreten. Dieser Gegensatz gilt also vielleicht auch für das Fettgewebe.

Eine Frage, die bei der Pathogenese des Morbus Addison viel diskutiert wurde, ist die Ursache der Pigmentierungen. Ausgehend von der Hypothese, daß die Pigmentierungen, die man nach langwähriger ACTH-Behandlung oft sehen kann, mit erhöhtem Gehalt an Intermedin — d. h. an melanophorenaktivem Hormon — erklärt wird, haben Högberg und Johnsson in unserer Klinik den Gehalt an Intermedin im Blut von Kranken mit Morbus Addison untersucht. Es wurde dabei in den meisten Fällen eine bedeutende Erhöhung nachgewiesen. Der Intermedingehalt in unseren Fällen wird ganz unten an der Kurve angegeben. Man sieht, wie der Gehalt während der Behandlung abnimmt.

Es ist mehrfach diskutiert worden, weshalb die Therapie mit DOCA keinen Einfluß auf die Pigmentierungen beim Addison ausübt. Andererseits scheint es aber, als ob die Therapie mit Cortison jetzt imstande wäre, die Pigmentierung bei der Addisonschen Krankheit zum Verschwinden zu bringen. Wir haben in mehreren Fällen beobachtet, wie die Schleimhautpigmentierungen bedeutend abnahmen, ja sogar verschwanden, und die allgemeine Hautfarbe auch deutlich normaler wurde. Solche Beobachtungen sind auch von anderen Autoren bei der Cortisonbehandlung von Addisonkranken notiert.

Es ist also durchaus möglich, daß das Cortison den Intermedinspiegel im Blut senkt. Der Zusammenhang von Intermedin und ACTH ist immer noch nicht klargelegt. Offenbar bestehen aber sehr enge Beziehungen, und es scheint jetzt wahrscheinlich, daß das Intermedin einen Teil des großen ACTH-Proteins darstellt. Wenn die Pigmentierungen wirklich mit einem hypophysären Faktor zusammenhängen, würde dies auch andere Tatsachen erklären. Man hat nämlich seit langem die Beobachtung gemacht, daß Leute mit NNR-Insuffizienz nach Schädigung der Hypophyse immer blaß sind und daß nur bei primärer Schädigung der NN die dunkle Farbe erscheint. Es ist eine allgemeine Regel, daß Wegfall der Hormonproduktion einer peripheren Drüse eine Vermehrung des betreffenden Tropins in der übergeordneten Hypophyse mit sich führt. Es wäre also funktionell durchaus verständlich, wenn ACTH-Protein in größeren Mengen im Blut beim Addison vorkommen würde. Dies ist auch durch die Untersuchungen von Sayers u. Mitarb. wahrscheinlich gemacht worden. Die Möglichkeit, daß der vermehrte Intermedingehalt mit einem erhöhten ACTH-Spiegel verbunden ist, kann also nicht ohne weiteres abgelehnt werden.

Zusammenfassung.

Es werden eine Reihe von Tatsachen dargestellt, die schwerlich mit der Annahme einer Wirkung des Adrenalins auf die eosinophilen Zellen in Blut durch Vermittlung von aus der Hypophyse freigemachtem ACTH zu erklären sind. Die Annahme, daß Adrenalin direkt auf die Depots von Glucocorticoiden, teils in der Nebennierenrinde und möglicherweise auch anderswo wirkt, würde die Tatsachen am besten erklären. Diese Hypothese würde auch den nahen räumlichen Zusammenhang zwischen Nebennierenmark und Rinde verständlich machen.

(Die Arbeit wurde durch Mittel von Statens medicinska Forskningsråd unterstützt. Herr cand. med. L. Zenk war mir bei der Zusammenstellung der Daten behilflich, wofür ich ihm meinen besten Dank sage).

Literatur.

Heni, F., u. J. Krauss: Klin. Wschr. **1953**, 6. — Högberg, B., u. S. Johnsson: Nature **169**, 286 (1952). — Kark u. Muehrke: Lancet **II**, 1189 (1952). — Lohmeyer, G., u. H. Hüsselmann: Klin. Wschr. **1953/I**, 1. — Luft, R.: Acta med.

scand. (Stockh.) **115**, 247 (1943). — Markee, J. E., J. W. Everett and Ch. Sawyer: Recent progress in hormone research **6**, 139 (litt) (1952). — Muehrke: J. Labor. a. clin. Med. **1952**, 169. — Recant et al.: J. Clin. Endocr. **8**, 589 (1948). — Rud, W., R. C. Muehrke u. R. M. Kark: J. Clin. Invest. **30**, 129 (1951). — Ruppel, W., u. A. Hitzelberger: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 926. — Thorn: Diagnosis and treatment of Addison's disease. Springfield Ill. 1951. — Thorn, G. W., u. P. F. Forsham: Recent progress in hormone research Vol. **4**, 229 (1949). — Vogt, M.: J. of Physiol. **118**, 588 (1952). — Waldenström, J.: Acta endocr. **5**, 235 (1950). — Westman, A., u. D. Jacobsson: Acta obstetr. gynec. Scand. (Stockh.) **20**, 392 (1940).

Prof. Dr. Jan Waldenström, Med. Univ.-Klinik Malmö/Lund, Schweden.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 83—99 (1953).

Aus dem „Merck Institute for Therapeutic Research" Rahway, N. Y.
und der pharmakol. Abteilung des Mount Sinai Hospitals, N. Y.

Über Hemmungs- und Potenzierungs-Phänomene am quergestreiften Muskel*.

Von
F. P. Pick, H. L. Hollinck und G. Zacharellis.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. März 1953.)

In einer früheren Mitteilung[30] wurde gezeigt, daß der Zusatz von Glutathion und Thiamin zu dem in Ringer-Lösung suspendierten M. Rectus abdominis von Esculenten und Temporarien denselben vor der Kontraktion mit kräftigen Muskelgiften, wie Prostigmin, Ryanodin und Neoarsphenamin schützt. Dabei ergab sich, daß der durch Curare sowie Thiole vorbehandelte Muskel in zweifacher Art mit Acetylcholin reagieren kann: einmal derart, daß durch Zusatz von kleinen, an sich motorisch unwirksam gewordenen Acetylcholindosen (0,1—0,5 γ) der Muskel für nachfolgende *Prostigminbehandlung* und dadurch erzeugte Kontraktion überaus empfindlich wird, andererseits in der Weise, daß Prostigminzusatz, dessen motorische Muskelwirkung durch Curare oder Thiole gehemmt worden war, am Muskel eine hohe Empfindlichkeitssteigerung für *nachfolgend zugesetztes Acetylcholin* bewirkt. Die contractionserregende Muskelwirkung des Prostigmins und seine sensibilisierende Fähigkeit sind demnach voneinander verschieden. Um über diese beiden Empfindlichkeitsphänomene des quergestreiften Muskels und die dabei beobachtete Funktion des Acetylcholins und Prostigmins neue Aufschlüsse zu gewinnen, wurden die folgenden Untersuchungen angestellt. Dieselben beschäftigten sich mit der Einwirkung zahlreicher organischer Substanzen, deren Hemmungseffekt auf die quergestreifte Muskulatur teilweise bekannt war, die aber mit modernen Erregungsmitteln bisher nicht in Verbindung gebracht worden waren.

Methode.

Die hier besprochenen Untersuchungen wurden wie jene vorher (Pick u. Tullius[31], Pick u. Hollinck[30]) am M. rectus von männlichen Esculenten und Temporarien durchgeführt; der in 8 cm³ mit O_2 durchlüfteten Ringer-Lösung bei p_H 7,5 in üblicher Weise aufgehängte Muskel schrieb seine Bewegungen mit dem im Gleichgewicht gehaltenen Schreiber an dem berußten Kymographion bei Zimmertemperatur von 24° C.

* Zur Feier des 80. Geburtstages von Professor Dr. Otto Loewi in alter Freundschaft und aufrichtiger Verehrung. (E. P. P.)

Die benützten Pharmaka waren meist hergestellt von Merck u. Co. Inc. in Rahway, N. J., Prostigminmethylsulfat in Lösung von 1:1000 von Hoffmann-La Roche, Nutley. Die prostigminähnlichen neuen Muskelstimulantien RO 2-3198 (Tensilon) und RO 2-2561 waren liebenswürdigerweise dem einen von uns (E. P. P.) von Dr. Leo A. Pirk der gleichen Firma überlassen, das Tetraäthylpyrophosphat, gelöst in Propylenglykol, war von Victor Chemical Works in Chicago 4, Ill., geliefert worden. Hydro-Stilbamidin verdanken wir Prof. Dr. I. Snapper, Synthalin war einem von uns durch Dr. W. Graubner (H. Boehringer's Sohn), Ingelheim a/Rh. und Dr. R. Tislow der Schering Corp. in Bloomfield, N. J., gütigst überlassen worden; reinstes Paludrin entstammte der Freundlichkeit von Dr. Kr. K. Chen der Lilly Research Labs. in Indianapolis. Für die gütige Unterstützung sind wir allen genannten Herren und Institutionen zum großen Dank verpflichtet.

Als Hemmungsstoffe erwiesen sich 4 verschiedene Gruppen organischer Substanzen am isolierten rectus abd. recht wirksam: 1. neben Acetamid mannigfache aliphatische und aromatische Amidine, 2. Guanidin, Creatin und die Diguanidine Synthalin und Paludrin, 3. Lokalanästhetika wie Cocain, Procain und Magnesiumsulfat und schließlich 4. die schon früher angewandten Thiole Glutathion und Thiamin.

Als Erregungsmittel des durch diese Stoffe gehemmten Muskels dienten die bereits von einer Reihe von Autoren (Randall[32], Riker u. Weskoe[39], Hobbiger[19], Unna u. Mitarb.[37]) sorgfältig geprüften Prostigmin-Derivate: das 3-Hydroxyphenyltrimethylammoniumbromid (RO 2-2561) und das 3-Hydroxyphenyldimethyläthylammoniumchlorid (RO 2-3198)/Tensilon. Diese beiden als Anticurarestoffe auch am Menschen benützten quaternären Ammoniumbasen sind viel weniger giftig als Prostigmin* und besitzen nach Randall nur etwa $^1/_{100}$ der Anticholinesterasewirkung des Prostigmins; der geringe muscarinartige Effekt des Tensilons (etwa $^1/_5$ des Prostigmins) befähigt diesen kurzwirkenden Curare-Antagonisten zum Ersatz des stark vagotropen und die Reizleitung des Herzens blokkierenden Prostigmins. Weiter verwendeten wir das Tetraäthylpyrophosphat, eines der stärksten Anticholinesterasen, welches von Burgen[4] und von Grob u. Harvey[16] sowohl experimentell an Tieren, wie therapeutisch an Menschen bei Myasthenia gravis verwendet wurde.

Ergebnisse.

1. Hemmung durch Acetamid und Amidine.

In diese Gruppe gehören neben Acetamid ($CH_3 . CO . NH_2$) und dem Acetamidin $CH_3 \cdot C(=NH) \cdot NH_2 . HCl$ eine Reihe aromatischer Amidine, die wertvolle Chemotherapeutika gegen menschliche Trypanomiasis, Kala-Azar, Leishmaniosis, Histoplasma capsulatum und Blastomyces-Dermatitides sind, vor allem das von Snapper, Lieben u. Mitarb.[35] klinisch und experimentell untersuchte *Stilbamidin* und das weniger toxische *2-HO-Stilbamidin* (4-4-diamidinostilben); beide sind nach Nachmansohn[2, 26] kräftige Antagonisten der Acetylcholinesterase und sollen nach ihm nicht nur die neuromuskuläre Übertragung wie Curare blokkieren, sondern auch die nervöse Leitung im Axenzylinder hemmen.

* Vgl. auch die günstigen Erfahrungen mit Tensilon am Menschen bei A. G. Doughty and W. D. Wylie: Brit J. Anaesth. **24**, 67 (1952).

Weitere hierher gehörige *Diamidine*, die ebenfalls als Chemotherapeutica gegen Trypanosomen benützt werden, sind *Propamidin*, *Pentamidin* und *Phenamidin*. Nach unseren Untersuchungen hemmen alle diese Amidine wie auch Acetamid die quergestreifte Muskulatur und die von uns benützten Stimulantien Tensilon, RO 2 - 2561, Prostigmin und Tetraäthylpyrophosphat nach einer Einwirkungsdauer von 10—20 min. Die von uns verwendeten Dosen dieser Hemmungsstoffe betrugen in der Regel 40—50 γ, um 100—200 γ Tensilon oder RO 2—2561, bzw. 50 γ Prostigmin und 100—200—500 γ Tetraäthylpyrophosphat zu neutralisieren; es genügten aber zuweilen von manchen Diamidinen Dosen von 2—10 γ, wie z. B. von HO-Stilbamidin, um die obigen Muskel-Stimulantien zu hemmen.

Bemerkenswert ist, daß HO-Stilbamidin und die übrigen Amidine ähnlich wie d-Tubocurarin auch die Acetylcholincontraction hemmen, aber dadurch dem gehemmten Muskel eine hohe Empfindlichkeit für den nachfolgenden Zusatz eines der sonst gehemmten Muskel-Stimulantien verleihen. Umgekehrt veranlassen die von diesen Amidinen gehemmten Muskel-Stimulantien für eine nachfolgende, am unvorbehandelten Muskel unwirksame Acetylcholin- oder Kaliumchlorid-Dosis eine derartig hohe Empfindlichkeit, daß die vorherige Hemmung nunmehr von einer maximalen Acetylcholin- oder KCl-Muskelkontraktion abgelöst wird. Als Beispiel mag hier angeführt sein, daß ein mit HO-Stilbamidin oder Phenamidin vergifteter Froschmuskel imstande ist, das stark wirksame Erregungsmittel Tetraäthylpyrophosphat in Mengen von 500 γ an der Erzeugung von Kontraktion und Kontraktur zu verhindern und trotzdem den Muskel 15 min später für 2 γ Acetylcholin hochempfindlich zu machen; andererseits ist eine Vorbehandlung des mit den genannten Diamidinen gehemmten Muskels mit an sich für eine Contraction unwirksamen Mengen von 0,1 γ — 2 γ Acetylcholin genügend, um den bis dahin erschlafften Muskel für einen Zusatz der gleichen Dose Tetraäthylpyrophosphat rasch zu einer kräftigen Kontraktion zu bringen, wiewohl dieselbe Menge des Stimulans bei dem mit Acetylcholin unvorbehandelten Muskel völlig versagt hat (vgl. Abb. 1, sowie Versuchsprotokolle 2 und 3, bei denen der Kurvenverlauf sehr ähnlich war, wie auf Abb. 1). Diese Beispiele, die noch später ausführlicher

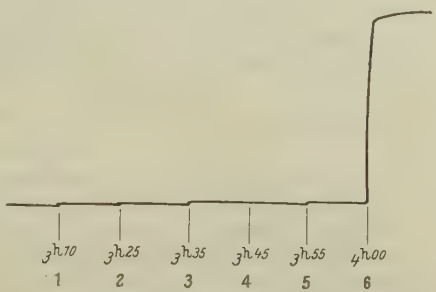


Abb. 1. Versuch 1: Hemmung von *Tetraäthylpyrophosphat* durch *Propamidin* und *Sensibilisierung* von *Acetylcholin* durch den motorisch gehemmten Erreger. Bei *1* 40 γ Propamidin, 15 min später bei *2* 500 γ Tetraäthylpyrophosphat: völlige motorische Hemmung durch 35 min; hier bei *6* 5 γ Acetylcholin mit sehr kräftiger, bei RINGER-Wechsel teilweise reversibler Kontraktion in 5 min.

besprochen werden sollen, zeigen den entscheidenden Einfluß der kleinsten Acetylcholinmengen für die Muskelkontraktion und den Muskelstoffwechsel scheinbar unabhängig von der chemischen Natur des Hemmungsgiftes.

Versuch 2: Hemmung von *Tetraäthylpyrophosphat* durch *Phenamidin* und Potenzierung des Acetylcholins durch das gehemmte Tetraäthylpyrophosphat.

Zusatz von 10 γ Phenamidinchlorhydrat ohne Wirkung, 10 min später 500 γ Tetraäthylpyrophosphat, dessen Wirkung durch 32 min gehemmt bleibt, bis das dann zugesetzte, durch das gehemmte Tetraäthylpyrophosphat potenzierte Acetylcholin (2 γ) eine starke, durch Ringer-Wechsel teilweise reversible Muskelkontraktion hervorruft.

Versuch 3: Hemmung des *Tetraäthylpyrophosphats* durch *2-Hydro-Stilbamidin* und *Potenzierung des Acetylcholins* durch das gehemmte Tetraäthylpyrophosphat. Zunächst 40 γ Hydro-Stilbamidin, 15 min später 500 γ Tetraäthylpyrophosphat, das durch weitere 15 min gehemmt bleibt, aber das dann zugesetzte Acetylcholin (2 γ) zu einer sehr kräftigen, irreversiblen Muskelkontraktur erregt.

2. *Hemmung durch Guanidin, Creatin und die Diguanidine Synthalin und Paludrin.*

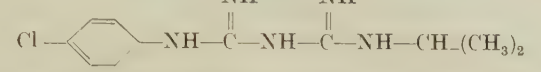
Daß Guanidin den quergestreiften Muskel für Acetylcholin bedeutend steigert und den isolierten Froschmuskel in der Konzentration von 0,2% curareähnlich lähmt, ist bereits vor langer Zeit durch E. Frank, Nothmann u. Guttmann[13] festgestellt worden; die Besserung der neuerdings beobachteten Muskelfunktion bei Myasthenia gravis (siehe Minot, Dodd u. Riven[25], Harvey[18]) durch Darreichung von Guanidin ist deswegen in unseren nachfolgend berichteten Versuchen von Interesse, weil diese Steigerung der Muskelfunktion auf eine Sensibilisierung durch Acetylcholin zurückgeführt wird, wiewohl Guanidin keine Anticholinesterase ist. Es darf daher angenommen werden, daß auch in unseren Versuchen dort, wo es sich um den mit Guanidin gehemmten und mit scheinbar unwirksamen Acetylcholindosen sensibilisierten Muskel handelt, so daß die Muskel-Erregungsmittel wieder kräftige Kontraktionen herbeiführen können, nicht um eine durch Anticholinesterase im Muskel freigewordene Acetylcholinmenge handelt; ebensowenig wahrscheinlich mag es sein, daß die schwachen und überdies durch Guanidin gehemmten Anticholinesterasen Tensilon und RO 2-2561 den mit Guanidin vergifteten Muskel auf diesem Wege für Acetylcholin hochempfindlich machen.

Auch das Diguanidin *Synthalin* (1,10-diguanidino-decan)

$$HN = C(NH_2)—NH—(CH_2)_{10}—NH—C—(NH_2) = NH—2\,HCl$$

ist seit lange sorgfältigen Untersuchungen durch Frank, Nothmann u. Wagner[14] unterworfen worden als Insulinersatz und Hemmungsstoff der Leberglykogenbildung bei Hypoglykämie und dabei anwachsender Bildung und Ausscheidung der Milchsäure, die übrigens auch bei Darreichung von Guanidin auf das 10fache ansteigt. Gleichzeitig hemmt Synthalin die Aminooxydase und die Desaminofunktion der Leber, wodurch eine ansehnliche Ausscheidung des Aminostickstoffes manchmal auftritt. Nach Junkmann[36] und Staub[36a] schädigt Synthalin die Atmung der Muskelzellen und daher auch die Resynthese der Milchsäure zu Glykogen; eine ähnliche Störung in dem Sauerstoffverbrauch des quergestreiften Muskels durch Guanidin und verschiedene Harnstoffderivate ist von Grant u. Krantz[15] beobachtet worden. Es mag hier schließlich bemerkt werden, daß Lourie u. Yorke[23] auf Grund der eben erwähnten Wirkungen vermuteten, daß dem Synthalin und den verwandten Diguanidinen trypanocide Eigenschaften innewohnen.

Unsere Versuche zeigten, daß neben Synthalin auch *Paludrin* (N_1-p-chlorophenyl-N_5-isopropylbiguanid)



oder Chlorguanid, das vortreffliche Antimalariamittel, sogar schon in kleinen Dosen von $3\,\gamma$ — $5\,\gamma$ — $10\,\gamma$ die erregenden Dosen von Prostigmin, Tensilon, RO 2 - 2561 und Tetraäthylpyrophosphat in ähnlicher Weise hemmen, wie Guanidin-HCl und Creatin-HCl. Gleich dem Guanidin-hydrochlorid, wurden auch die mit den übrigen Guanidin-Derivaten *Creatin-Hydrochlorid*, *Synthalin* und *Paludrin* gehemmten Muskel durch schwache Zusätze von $0{,}1\,\gamma$ — $0{,}5\,\gamma$ Acetylcholin für nachfolgende,

Abb. 2.

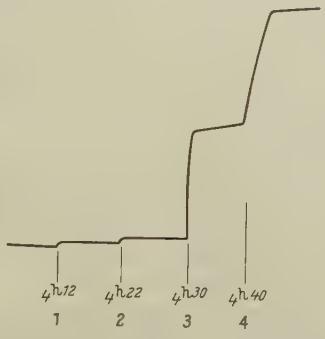


Abb. 3.

Abb. 2. Versuch 5: Hemmung von *Tensilon* durch *Guanidinchlorid* und *Sensibilisierung* des *gehemmten Tensilons für KCl*. Bei *1* 30 γ Guanidinhydrochlorid, 10 min später bei *2* 5 mg KCl und 5 min nachher bei *3* 200 γ Tensilon: beide bleiben motorisch unwirksam. Tensilon sensibilisiert, wiewohl selbst gehemmt, den Muskel für 5 mg KCl, die bei *4* dem Muskel zugesetzt, ihn in den nächsten Minuten in reversible Kontraktion versetzen.

Abb. 3. Versuch 8: Hemmung von Acetylcholin durch *Synthalin* und *Sensibilisierung* des motorisch unwirksamen Acetylcholins für *Prostigmin*. Bei *1* 20 γ Synthalin, dem 10 min später der Zusatz von 2 γ Acetylcholin bei *2* folgte; dieser bleibt motorisch unwirksam, sensibilisiert aber den gehemmten Muskel für 50 γ Prostigmin bei *3*: starke Muskel-Kontraktion in den nächsten 10 min (bei *4*).

sonst der Hemmung unterliegende Erregungsmittel sensibilisiert, die wieder ihrerseits selbst im gehemmten Zustande und im gehemmten Muskel eine derartige Potenzierung für Acetylcholin erzeugen, daß die kleinen Acetylcholindosen rasch eine kräftige Muskelkontraktion bewirken (vgl. die Abb. 2 und 3, sowie Versuchsbeispiele 4, 6 und 7).

Versuch 4: Hemmung von *Tetraäthylpyrophosphat* durch *Guanidin* und *Sensibilisierung* durch motorisch völlig gehemmtes Tetraäthylpyrophosphat für *Acetylcholin*.

Zusatz von $50\,\gamma$ Guanidinchlorid (ohne Wirkung), 10 min später $100\,\gamma$ Tetraäthylpyrophosphat. Nach 25 min wird der voll gehemmte Muskel mit $2\,\gamma$ Acetylcholin versetzt; es folgt in 2 min eine kräftige irreversible Muskelkontraktur.

Versuch 6: Hemmung von Acetylcholin durch *Guanidin* und Sensibilisierung durch gehemmtes Acetylcholin für *Tetraäthylpyrophosphat*.

Zusatz von 30 γ Guanidinchlorid, 10 min später 2 γ Acetylcholin, welche den gehemmten Muskel 10 min später für 100 γ Tetraäthylpyrophosphat sensibilisieren, so daß eine starke, nicht starre Muskelkontraktion einsetzt.

Versuch 7: Hemmung des Prostigmins durch *Paludrin* und *Sensibilisierung* des gehemmten Prostigmins für *Acetylcholin*.

Zusatz von 50 γ Paludrinchlorid, 10 min später 50 γ Prostigminmethylsulfat bleiben durch 30 min völlig gehemmt, sensibilisieren trotzdem den gehemmten Muskel für 2 γ Acetylcholin, die weitere 10 min später zugesetzt werden; starke, durch Ringer-Wechsel reversible Muskelkontraktion in 5 min.

3. Hemmung durch Cocainhydrochlorid, Procainhydrochlorid und Magnesiumsulfat.

Diese 3 Lokalanästhetika erzeugen neben der curareähnlichen Aufhebung der Reizübertragung an den neuromuskulären Endplatten zum Unterschied von Curare auch eine Hemmung von direkten Erregungen an der quergestreiften Muskulatur. Sie können sowohl eine Blockade der Nerven und der Muskeln herbeiführen, wie zahlreiche Untersuchungen, insbesondere von Harvey[18], Jaco u. Wood[20] an Nerven und Muskeln mit Procain-Vorbehandlung gezeigt haben; durch Acetylcholin, Prostigmin, Veratrin, Stoffe, welche eine erhebliche Depolarisierung des Muskels bzw. der Muskelmembranen bedingen (Fleckenstein[11], Shanes[33a], Nordquist[28], Harvey, Jaco u. Wood, Nachmansohn u. Mitarb.), können diese durch Procain hervorgerufenen Hemmungen aufgehoben werden. In gleicher Weise zeigen schon die Arbeiten von Meltzer u. Auer[24], sowie neuerdings jene von Seager u. Mitarb.[33], Gessler u. Matsuba[33] und K. Haess[27], daß Magnesiumsulfat eine direkte Muskelwirkung, wahrscheinlich durch Beeinflussung der Zellmembran des Muskels, ausübt.

In unseren Untersuchungen hat sich zeigen lassen, daß alle 3 Lokalanästhetika sowohl unsere Erregungsmittel wie auch Acetylcholin hemmen; allerdings liegen die hier wirksamen Dosen meist bei 0,1—0,2 mg Cocainhydrochlorid, 0,5 mg Procainhydrochlorid und bei 1—2 mg Magnesiumsulfat für 8 cc Ringerlösung, in welcher der Muskel hängt; die Mengen der benützten und gehemmten Stimulantien schwankten hier zwischen 50—100 γ Prostigmin, 200—500 γ Tensilon und RO 2-2561, 200—500 γ Tetraäthylpyrophosphat und 2—5 γ Acetylcholin.

Wie bei den früher beschriebenen Gruppen von Hemmungsstoffen konnte auch bei den hier benützten Lokalanästhetika trotz der Hemmung der stimulierenden Stoffe im gehemmten Muskel eine bedeutende Empfindlichkeitssteigerung für 2 γ Acetylcholin (mit Muskelkontraktion) erzeugt werden; umgekehrt vermochte bei Zusatz derselben kleinen und überdies motorisch gehemmten Acetylcholinmenge mit oder ohne Zusatz von 10 γ Atropinsulfat zu 8 cm^3 Ringer-Lösung jedes der vorher unwirksamen Stimulantien nunmehr eine hohe Sensibilitätserhöhung und bedeutende Kontraktionssteigerung in dem bis dahin in vollem Ruhezustande befindlichen Muskel hervorrufen (Vgl. die Abb. 4 sowie Versuchsbeispiele 9—11 und 13—14).

Versuch 9: Hemmung der *Tensilon-Erregung* durch *Cocainchlorid* und Sensibilisierung des gehemmten Tensilons für *Acetylcholin*.

Zusatz von 0,1 mg Cocainchlorid, 10 min später 10 γ Atropinsulfat und 5 min darnach Zusatz von 200 γ Tensilon, die motorisch gehemmt, den Muskel für eine kräftige Muskelkontraktion durch 2 γ Acetylcholin sensibilisieren.

Versuch 10: Hemmung des Acetylcholins durch *Cocainchlorid* und Sensibilisierung des gehemmten Acetylcholins für *Tensilon*.

Zusatz von 0,1 mg Cocainchlorid, 7 min später Zusatz von 10 γ Atropinsulfat und 5 min nachher 2 γ Acetylcholin. Nach 6 min Zusatz von 200 γ Tensilon, sensibilisiert durch gehemmtes Acetylcholin für eine sehr starke reversible Muskelkontraktion.

Versuch 11: Hemmung von *Tetraäthylpyrophosphat* durch *Procainhydrochlorid* und Sensibilisierung für *Acetylcholin* durch das gehemmte Muskelstimulans Tetraäthylpyrophosphat.

0,5 mg Procainhydrochlorid, 10 min später 200 γ Tetraäthylpyrophosphat; völlige motorische Hemmung desselben durch 20 weitere Minuten, bis 2 γ Acetylcholin eine starke, durch das gehemmte Tetraäthylpyrophosphat sensibilisierte Kontraktion in 3 min erzeugen.

Versuch 13: Hemmung des *Tensilons* durch *Magnesiumsulfat* und Sensibilisierung durch gehemmtes Tensilon für *Acetylcholin*.

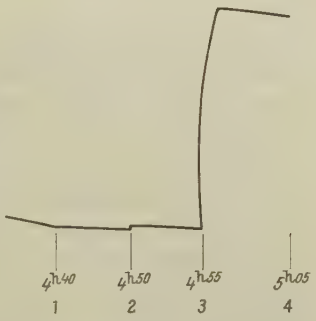


Abb. 4. Versuch 12: Hemmung des Acetylcholins durch *Procainhydrochlorid* und Sensibilisierung für *Tensilon* durch das gehemmte Acetylcholin. Bei *1* Zusatz von 0,5 mg Procainhydrochlorid; 10 min später bei *2* 2 γ Acetylcholin, welches das nachträglich (5 min später) zugesetzte Tensilon 400 γ bei *3* für die Muskelkontraktion potenziert.

Zunächst 2 mg $MgSO_3$; 7 min später 500 γ Tensilon und nach 10 min 2 γ Acetylcholin; dasselbe ist durch das gehemmte Tensilon sensibilisiert und erzeugt eine sehr kräftige, doch reversible Muskelkontraktion.

Versuch 14: Hemmung von Acetylcholin durch *Magnesiumsulfat* und Sensibilisierung durch gehemmtes Acetylcholin für *Tensilon*.

2 mg $MgSO_4$ und 4 min später 2 γ Acetylcholin, welches den Muskel 3 min später für 500 γ Tensilon sensibilisiert.

4. Hemmung durch Thiamin und Glutathion.

Es war zu erwarten, daß die Thiole Glutathion und Thiamin, welche die Muskelreizstoffe Prostigmin, Ryanodin und Neoarsphenamin (Pick u. Holland[1]) zu hemmen vermögen, auch die prostigminähnlichen muskelerregenden Derivate, wie auch das Tetraäthalpyrophosphat antagonistisch beeinflussen. Trotzdem Thiamin in früher mitgeteilten Untersuchungen nicht imstande war, 50 γ Prostigmin nach kurzer Reaktionszeit zu hemmen, wurde von uns nunmehr festgestellt, daß meist nach 20—30 min langer Einwirkungsdauer von 1—2 mg Thiamin sowohl Prostigmin (50 γ) wie Tensilon, RO 2-2561 (100—200 γ) und Tetraäthylpyrophosphat (in Dosen von 200—500 γ) in der stimulierenden Muskelwirkung völlig gehemmt werden; bei Glutathion ist zur Hemmung dieser Stimulantien ein Zusatz von 2—4 mg nötig. Cystein und Methionin

erwiesen sich für die Neutralisierung auch in größeren Mengen unwirksam. Wie in den vorher erwähnten Versuchen, sowie in den schon früher über die Thiamin- und Glutathionhemmung berichteten, waren alle hier benützten Stimulatoren trotz ihrer gehemmten motorischen Muskelfunktion fähig, den Muskel für die Kontraktion durch kleinste Dosen von Acetylcholin (2—5 γ) hochempfindlich zu machen. In gleicher Weise unterbrach die Vorbehandlung des thiamingehemmten Muskels mit Acetylcholin (0,5 γ) oder mit KCl (5 mg) die Muskelhemmung und machte den Muskel überaus reaktionsfähig für vorher unwirksame Dosen von 100 γ Tensilon, 100 γ RO 2-2561 oder 200 γ Tetraäthylpyrophosphat; gleiches Verhalten gilt auch für die Glutathionhemmung (vgl. die Abb. 5, sowie Versuchsbeispiel 15 und 17).

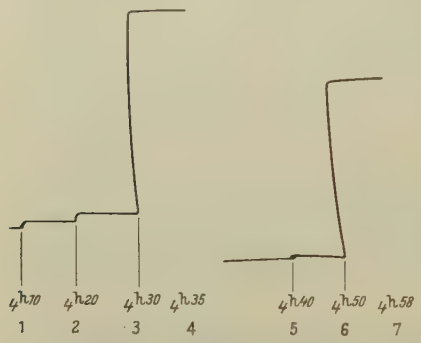


Abb. 5. Versuch 16: Hemmung des *Tensilons* durch *Thiamin* und Sensibilisierung durch das gehemmte *Tensilon* für Acetylcholin; der nach Ringer-Wechsel wieder erschlaffte Muskel bleibt *gehemmt fur Tensilon*, ist aber wieder erregbar für Acetylcholin. Bei *1* 2 mg Thiaminchlorid; 10 min nachher bei *2* 100 γ Tensilon, die, obschon gehemmt, den Muskel für 2 γ Acetylcholin (bei *3*) 10 min später überempfindlich machen; der Ringer-Wechsel 5 min später läßt den Muskel erschlaffen; der Muskel bleibt 5 min nachher noch unempfindlich für 100 γ Tensilon (bei *5*), obschon er 10 min später (bei *6*) durch 2 γ Acetylcholin wieder kontrahiert werden kann.

Versuch 15: Hemmung des Acetylcholins durch *Glutathion* und Potenzierung für *Tetraäthylpyrophosphat* durch gehemmtes Acetylcholin.

Zunächst werden 2 mg Glutathion, 10 min später 0,5 γ Acetylcholin und nach weiteren 10 min 50 γ Tetraäthylpyrophosphat zugesetzt: es erfolgt in den nöchsten 20 min eine kräftige, aber nicht starre Muskelkontraktion.

Versuch 17: Hemmung von KCl durch *Thiamin* und Sensibilisierung durch *KCl für Tetraäthylpyrophosphat.*

Zuerst Zusatz von 2 mg Thiamin-hydrochlorid, 10 min später 5 mg KCl, welche die (5 min später) nachfolgenden 200 γ Tetraäthylpyrophosphat für eine kräftige Muskelkontraktion, die in Starre übergeht, sensibilisieren.

Besprechung.

Die hier untersuchten 4 Gruppen von Hemmungsstoffen: *Amidine*, *Diamidine*, *Guanidine*, *Diguanidine*, *Lokalanästhetika* und *Thiole* unterscheiden sich zweifellos in ihrer hemmenden Muskelwirkung sowohl qualitativ wie quantitativ. Während die Amidine und Guanidine in relativ kleinen Dosen (im Durchschnitt 25—50 γ, mitunter auch schon in Mengen von 5—10 γ in 8 cc Ringer-Lösung) nach einer Einwirkungsdauer von 10—15—20 min den Froschrectus vor einer Contraction mit Prostigmin und ähnlichen Verbindungen sowie vor einer Reaktion mit Tetraäthylpyrophosphat schützen, müssen Lokalanästhetika Cocain,

Procain und Magnesiumsulfat in Mengen von 100—500 γ bis 1 mg zugeführt werden und von Thiamin sind oft 2 mg, von Glutathion sogar 2—4 mg in 8 cm³ RINGER-Lösung nötig, um den bei 7,5 p_H suspendierten Rectus zu hemmen. Dabei spielt auch die chemische Natur des angewendeten Erregungsmittels qualitativ wie quantitativ eine große Rolle. Es hat sich ergeben, daß die rasch und kurz wirkenden Muskelerregungsmittel Tensilon (3-Hydroxyphenyldimethyläthylammoniumchlorid, RO 2-3198) und 3-Hydroxyphenyltrimethylammoniumbromid (RO 2-2561) unter gleichen Bedingungen am leichtesten inaktiviert werden können, wobei das Tensilon rascher als die ihm analoge Trimethylammonium-Base (RO 2-2561) antagonistisch beeinflußt werden kann; Prostigmin und Tetraäthylpyrophosphat schienen der Hemmung viel länger zu widerstehen.

Es mag dabei daran erinnert sein, daß die beiden letzteren langwirkenden quaternären Ammoniumbasen sehr kräftige Cholinesterasehemmer sind, während die erstgenannten nach RANDALL[32] nur etwa ein Hundertstel der Wirkung des Prostigmins besitzen. Es wäre daher möglich, daß die verhältnismäßig schwache Freisetzung von Acetylcholin im Muskel mit der kurzdauernden Muskelerregung durch Tensilon und RO 2-2561 in Verbindung steht. Die *qualitative* Verschiedenheit der Stimulantien geht schon daraus hervor, daß die beiden kurzwirkenden quaternären Ammoniumbasen Tensilon und RO 2-2561 eine sehr leicht reversible Muskelkontraktion erzeugen, während Prostigmin und Tetraäthylpyrophosphat, zumal in Verbindung mit Acetylcholin vielfach irreversible Kontrakturen am Muskel bewirken. Die *quantitative* Differenz der Stimulantien äußert sich in den für die Muskelcontraction des isolierten Rectus zweckmäßigen Dosen, welche bei unserer Versuchsordnung für Tensilon und RO 2-2561 100—200 γ, für Prostigmin 10 bis 20 γ und für Tetraäthylpyrophosphat 50—100 γ betrugen.

Während die verschiedenen Hemmungsstoffe der 4 untersuchten Gruppen die oben genannten Muskelstimulantien motorisch gehemmt haben, so daß die Muskulatur scheinbar im normalen Ruhezustand blieb, zeigte sich bei nachträglichem Zusatz von an sich kaum wirksamen Mengen von (0,1—0,5 γ) Acetylcholin oder KCl (5 mg), daß der scheinbar ruhende, motorisch unveränderte Muskel dennoch eine bedeutende Veränderung erfahren hat; denn die vorher gehemmten Stimulantien haben den ruhenden Muskel für den neuen, durch Acetylcholin gesetzten Reiz überempfindlich gemacht, so daß er auf sonst unwirksame Acetylcholindosen mit kräftiger Kontraktion reagiert; ähnlich ist der Muskel auch gegen kleine Dosen von KCl reaktionsfähig geworden, wenn diese den anscheinend unwirksamen Erregern 5 oder 10 min später zugesetzt worden sind. Die Vorbehandlung des motorisch gehemmten Muskels

mit den genannten Stimulantien mag trotz des scheinbaren Ruhezustandes eine Veränderung der Muskelmembran oder der Muskelfibrillen oder beider erzeugt haben, so daß zugesetztes Acetylcholin oder KCl rascher durch die Muskelmembran die Muskelfibrillen erreichen und diese kontrahieren können. Es liegt nahe, auf Grund der Untersuchungen von Eccles[8], Fleckenstein[12], Kuffler[21] und Feldberg[9] anzunehmen, daß die benützten Stimulantien zu schwach waren, die unter dem Einfluß der *Hemmungsmittel repolarisierte und gedichtete Muskelmembran* in genügender Menge zu passieren, um den gehemmten Muskel zu depolarisieren und eine Contraction desselben zu bewirken. Erst der Zusatz von stärkeren Depolarisatoren, wie Acetylcholin oder Kaliumchlorid bewirkt eine rasche potenzierte Acetylcholin- oder Kaliumchloridkontraktion in dem bisher gehemmten Muskel; dieser hat aber infolge der stimulierenden Vorbehandlung wahrscheinlich schon eine Permeabilitäts-Steigerung seiner Zellmembranen erfahren und wurde dadurch für die genannten Depolarisatoren wie für die an sich schwächeren Stimulatoren durchgängig und empfindlich. Wie weit die Acetylcholinpotenzierung dieser motorisch gehemmten Muskeln außerdem mit der Freisetzung von Acetylcholin im Muskel selbst, z. B. durch die „Anticholinesterasen" der benützten Stimulantien oder auf einem anderen Wege zusammenhängt, geben unsere bisherigen Versuche keinen sicheren Aufschluß. Es muß aber hier bemerkt werden, daß Hemmungssubstanzen ohne Anticholinesterasen-Wirkung, wie die Guanidine, die gleiche Ausbildung der Potenzierung für Acetylcholin oder Kaliumsalze erlaubten, wie andere Hemmungsstoffe, wenn sie mit obigen Stimulantien vorbehandelt waren. Andererseits blieben die gehemmten Muskeln trotz Vorbehandlung mit den sonst stimulierenden „Anticholinesterasen" in voller Ruhe bis zu dem Augenblick, in dem das zugesetzte, an dem nicht vorbehandelten Muskel kaum wirksame Acetylcholin oder Kaliumchlorid eine volle Depolarisierung der Muskelmembranen und Muskelfibrillen herbeiführte, wobei die durch die Hemmungsstoffe bewirkte Repolarisierung und Membrandichtung aufgehoben und der bis dahin den Stimulantien versperrte Durchgang durch die Muskelzellmembranen geöffnet worden war. Wie weit der repolarisierende Einfluß der Muskelhemmungsstoffe reicht, läßt sich aus Versuchen entnehmen, in denen der unter der potenzierten Acetylcholinkontraktion gestandene, vorher gehemmte Muskel durch wiederholten Ringer-Wechsel zur vollen, scheinbar normalen Erschlaffung gebracht wurde, aber trotzdem für die schwächeren Stimulantien, wie Tensilon oder RO 2-2561 unerregbar blieb, weil sie offenbar zu schwach waren, die repolarisierten, nunmehr wieder gedichteten Membranen zu passieren; erst neuerdings dargereichtes Acetylcholin hat abermals eine volle Depolarisierung bewirkt und den potenzierenden Stimulantien

den Weg zur Kontraktion der Muskelfibrillen gebahnt (vgl. Abb. 5). Es mag hier übrigens auch daran erinnert werden, daß die Potenzierung des Acetylcholineffektes am M. rectus durch Veratrin oder Sulfacyanid auch nach Hemmung der Cholinesterase durch vollständige Eserinisation unverändert eintritt (Vanremoorter[38]). Trotzdem ist es möglich, daß neben den hier zur Erklärung der Hemmung und Potenzierung herbeigezogenen Repolarisierungs- und Depolarisierungsprozessen noch andere Reaktionen unter dem Einflusse der von uns benützten stimulierenden Anticholinesterasen mitspielen, wie insbesondere die Freisetzung kleiner Mengen von Acetylcholin oder von Kalium-Ionen. So zeigten Burns u. Paton[29], daß bei Tetanisierung des motorischen Nerven eine erhebliche Verstärkung der Depolarisierung des normalen Muskels durch Zusatz von Anticholinesterasen, wahrscheinlich durch Freisetzung von Acetylcholin, eintreten kann. Da im besonderen durch Kalium-Ionen an den gehemmten und durch Anticholinesterasen vorbehandelten Muskelfasern eine ähnliche Potenzierung wie durch Acetylcholin zu erzeugen ist (vgl. Abb. 2 und Versuch 17), scheint es, daß die Anticholinesterasewirkung, wenigstens in unseren Versuchen, keine so entscheidende Rolle für die Potenzierung spielt, wie in den bemerkenswerten quantitativen Auswertungen von Unna u. Mitarb.[34] am Froschrectus, in denen positive Beziehungen zwischen der Acetylcholinpotenzierung, der Cholinesterasehemmung und deren Antagonismus gegen Curare zu finden waren.

In Übereinstimmung mit unseren früheren Untersuchungen an curarisierten Muskeln hat sich auch an den anderweitig gehemmten Muskeln zeigen lassen, wie groß die Bedeutung selbst kleinster Mengen von Acetylcholin und KCl für die Potenzierung der oben angeführten Stimulantien sein kann trotz der motorischen Muskelhemmung. Die vorher angeführten Beispiele mögen die Sensibilisierung der Muskeln für die genannten Stimulantien im Vergleich mit der Potenzierung für Acetylcholin und Kalium-Ionen aufzeigen. Sie lassen klar die große Bedeutung dieser beiden Stoffe für die Muskelerregung und Kontraktion erkennen, selbst wenn sie allein in den angewandten Dosen nicht imstande sind, infolge der Hemmung durch die repolarisierenden Muskelgifte die Muskelcontraktion durchzuführen. Die durch diese beiden Erregungsstoffe bedingte Depolarisierung und Durchgängigkeitserhöhung der Zellmembranen des Muskels ermöglicht es den wenige Minuten später dem Muskel zugesetzten Stimulantien zu den Muskelfibrillen des bis dahin völlig polarisierten und an den Zellmembranen gedichteten Muskels zu gelangen und nun gemeinsam mit den kräftigeren Depolarisatoren den Muskel zur Kontraktion bzw zur Kontraktur zu bringen. Diese Empfindlichkeits-Steigerung scheint auch hier weitgehend unabhängig zu sein von der chemischen Zusammensetzung der Hemmungs-

stoffe wie auch aus den früher angeführten Gründen von der Hemmung der Cholinesterase des Muskels. Denn die verschiedensten Hemmungsstoffe, wie Curare, Amidine, Diamidine, Guanidin, Creatin, Diguanidine, Lokalanästhetika und Thiole werden in gleicher Weise durch Vorbehandlung mit Acetylcholin und KCl für die oben angeführten Stimulantien empfindlicher gemacht.

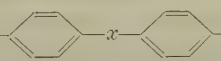
Es kann kaum ein Zweifel bestehen, daß die Vorbehandlung sowohl mit Acetylcholin wie mit den Kalium-Ionen für diese Erregbarkeits-Steigerung von allergrößter Bedeutung ist. Wie sehr bei dem hier beobachteten Phänomen der erhöhten Potenzierung durch Acetylcholin auch das dabei freigemachte Kalium mitbeteiligt ist, mag hier vorläufig offen bleiben. Die seit den Studien von Lehnartz[22], Duliere u. Loewi[7], neuerdings von Cicardo u. Moglia[6], sowie Bacq[1], Fenn u. Gerschmann[10], Hardt u. Fleckenstein[12] immer wieder bestätigte Tatsache, daß Acetylcholin das Kalium der verschiedenen Organe und insbesondere des Muskels freimacht, spricht dafür, daß die Empfindlichkeits-Steigerung des Muskels gegen die benützten Stimulantien ebenso wie vorher gegen Acetylcholin und Kalium wahrscheinlich unabhängig von der Cholinesterasehemmung wesentlich durch die Depolarisierung und Permeabilitätserhöhung der Muskelzellen infolge gemeinsamer Wirkung von Acetylcholin und den freigemachten Kalium-Ionen herbeigeführt wird. Die grundsätzlich wichtige Frage, ob die hier besprochenen Muskelsensibilisierungen ohne nervöse Unterstützung erfolgen, läßt sich vorläufig nur dahin beantworten, daß Stoffe, welche die Nervenenden blockieren, wie Cocain, Procain, Magnesiumsulfat keinerlei Behinderung in der Bildung und Betätigung der Muskelsensibilatoren erzeugen. Danach besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß manche der hier besprochenen Potenzierungsphänomene, wie die mittels Lokalanästhetika als Hemmungsstoffe erzeugten, auch *ohne* Nervenbeteiligung stattfinden. Wir sehen daher in unseren Versuchen an der gehemmten Muskulatur die wichtige Rolle des Acetylcholins und der Kalium-Ionen als *bedeutungsvolle Sensibilisatoren der quergestreiften Muskulatur vielleicht sogar ohne wesentliche Nervenbeteiligung*, und es liegt nahe, diesen beiden Stoffen schon unter physiologischen Bedingungen die Aufgabe von Vermittlern für die Erregung und Kontraktion der quergestreiften Muskulatur zuzuschreiben. Bekanntlich haben schon Bülbring u. Burn[3] kürzlich den seit vielen Stunden *stillstehenden* Kaninchenvorhof durch kleine Acetylcholindosen zum Schlagen gebracht und überdies aus schlagenden Vorhöfen größere Acetylcholinmengen zu extrahieren vermocht als aus stillstehenden. Die Erregungs-Steigerungen mit Acetylcholin und KCl in unseren gehemmten Muskeln scheinen in gleichem Sinne für eine höchst wichtige intermediäre, rein muskuläre Funktion des Acetylcholins zu sprechen.

Versuchs-Übersicht.

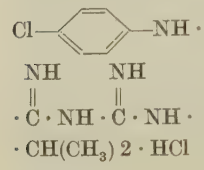
I. Potenzierung des Acetylcholins durch gehemmte Muskel-Erregungsmittel.

Im folgenden sollen an einzelnen Beispielen die quantitativen Beziehungen zwischen den angewandten Muskel-Hemmungsstoffen und den dem RINGER zugesetzten Muskel-Erregern aufgezeigt werden, die in den hier benützten Mengen völlig gehemmt sind, so daß der Muskel im Ruhestand bleibt; in der letzten Kolonne ist die verwandte Menge des

	Muskel-Hemmungsstoff in γ-Dosen	Prostigminmethylsulfat in γ-Dosen	Tensilon in γ-Dosen	RO 2-2561 in γ-Dosen	Tetraäthylpyrophosphat in γ-Dosen	Acetylcholin in γ-Dosen
			1. Amide und Amidine.			
a) Acetamidhydrochlorid $CH_3 \cdot CO \cdot NH_2 \cdot HCl$	40–50	50	200	—	5000	0,5–2
b) Acetamidinhydrochlorid $CH_3 \cdot C(=NH) \cdot NH_2 \cdot HCl$	25–30	50	100	—	—	2–5
c) Propamidindihydrochlorid* $x = -O \cdot (CH_2)_3 \cdot O-$	20–40	50	500	—	500	2
d) Pentamidindihydrochlorid* $x = -O \cdot (CH_2)_5 \cdot O-$	5–50	50; 100	100	100–200	100	2
e) Phenamidin* (Merck u. Co., Inc.) $x = -O-$	2–5–40	—	100–500	200	200–500	2
f) 2 HO-Stilbamidin* $x = -CH = CH-$	2–10–40	50; 100	100–200–500–1000	100	100–500	2–5
			2. Guanidin, Creatin und Diguanidine.			
a) Guanidin HCl	20–30–40	50–100	200	200	100	2–5
b) Creatin HCl	5–30–50	100	300–500	—	100	2
c) Synthalin-Di-Hydrochlorid** (Dekamethylen-Diguanidin)	10–20–40	50	200	100–1000	200	0,5

* $NH = (NH_2) \cdot C$–  –$C(NH_2) = NH$.

** $HCl \cdot H_2N-C(=NH)-HN-(CH_2)_{10}-NH-C(=NH)-NH_2 \cdot HCl$.

	Muskel-Hemmungsstoff in γ-Dosen	Prostigminmethylsulfat in γ-Dosen	Tensilon in γ-Dosen	RO 2—2561 in γ-Dosen	Tetraäthylpyrophosphat in γ-Dosen	Acetylcholin in γ-Dosen
2. Guanidin, Creatin und Diguanidine. (Fortsetzung.)						
d) Paludrin (Chlorguanid-hydrochlorid) 	10–20–50	50	100	—	200	5
3. Lokalanästhetika in mg-Dosen.						
a) Cocainhydrochlorid	0,1–0,2–0,25	50	200	200	keine Hemmg. in 200–500	2
b) Procainhydrochlorid	0,5	50–100	500	—	200	2
c) Magnesiumsulfat	2	50	500	—	—	2
4. Thiole in mg-Dosen.						
a) Thiaminhydrochlorid	2	50	100–200–1000	50–100	200–500	1–2
b) Glutathion	2–4	50	100	—	50	0,5-1,0-5,0

zuletzt dem Ringer zugefügten Acetylcholins verzeichnet, welches durch die in die Ringer-Lösung vorher gegebenen, aber gehemmten Erregungsmittel zur maximalen Kontraktiondes Muskels potenziert worden war.

II. Potenzierung der Muskel-Erregungsmittel durch gehemmtes Acetylcholin.

Die hier in gleicher Weise wie in der vorigen Übersicht geordneten Muskel-Hemmungsstoffe wurden 10—15 min lang auf den in Ringer-Lösung suspendierten Muskel einwirken gelassen; hierauf wurde Acetylcholin in Dosen von 0,1—2 γ zugesetzt. Diese geringen Acetylcholinmengen werden von den angewandten Hemmungsstoffen in ihrer Muskelwirkung motorisch unwirksam gemacht, sind aber trotzdem imstande, den Muskel innerhalb 10—15 min für die in der vorhergehenden Versuchsanordnung völlig gehemmten Muskelerreger überempfindlich zu machen, so daß deren Zusatz den Muskel nunmehr zur kräftigen Kontraktion anregt. Auf diese Weise wurde die Potenzierung aller von uns benützten Stimulantien (Prostigmin, Tensilon, RO 2-2561, Tetraäthyl pyrophosphat) erzielt.

	Muskel-Hemmungsstoffe in γ-Dosen	Acetylcholin in γ-Dosen	Prostigminmethylsulfat in γ-Dosen	Tensilon in γ-Dosen	RO 2-2561 in γ-Dosen	Tetraäthylpyrophosphat in γ-Dosen
1. Amide und Amidine.						
a) Acetamidhydrochlorid	40–50	0,1–2–5	50	200	—	500
b) Acetamidinhydrochlorid	25–30	0,5–2	50	10	—	—
c) Propamidindihydrochlorid	40	2	50	—	—	—
d) Pentamidindihydrochlorid	5	2	50	—	—	—
e) Phenamidin (Merck u. Co., Inc.)	40	2	—	500	—	500
f) 2 HO-Stilbamidin.	2–40–100	0,1–2	50	—	—	500
2. Guanidin, Creatin und Diguanidine.						
a) Guanidin HCl	20–30–40	2–7	50	200	—	100
b) Creatin HCl	5	2	50	—	—	—
c) Synthalin-Di-hydrochlorid	10–20–40	0,1–2	50	200	100	200
d) Paludrin	20	2	50	100	—	—
3. Lokalanästhetika in mg-Dosen.						
a) Cocain HCl	0,1–0,2	2	50	200	200	—
b) Procain HCl	0,5	2	—	400–500	—	—
c) Magnesiumsulfat	2	2	50	—	—	—
4. Glutathion und Thiamin-Hydrochlorid in mg-Dosen.						
a) Thiamin HCl	1–2	0,5	—	100	100	200
b) Glutathion	2–4	1—0,5	50	50	50	50

Summary.

1. Studies were carried out on isolated striated muscles (M. Rectus abdom. of frogs), which were previously inhibited by four groups of different organic compounds: a) Amides, Amidines and Diamidines, b) Guanidine, Creatine and Diguanidines, c) Localanesthetics, d) Thiols. The muscles were then treated with the following muscle-stimulants: *Prostigmine*, the prostigmine like quaternary ammonium bases *Tensilon* (3-hydroxyphenyldimethylethylammoniumchloride [RO 2-3198]) and 3-hydroxyphenyltrimethylammoniumbromide (RO 2-2561) as well as

Tetraethylpyrophosphate. Of these drugs Tensilon was blocked most readily, followed by RO 2-2561; Prostigmine and Tetraethylpyrophosphate as the stronger stimulants, were also more difficult to block

2. The inhibited muscles, even after failing to react to the above mentioned stimulants, are sensitized by these ineffective compounds to respond with a strong contraction on addition of small doses of Acetylcholine or Potassium chloride, which alone would be unable to produce contraction of the inhibited or even the normal muscle *(Potentiation of Acetylcholine or Potassiumchloride by inhibited muscle-stimulants)*.

3. The inhibited muscles are sensitized, on the other hand, by the addition of small, apparently ineffective amounts of Acetylcholine or Potassiumchloride, because in their presence the above mentioned otherwise inactive muscle-stimulants induce a maximum contraction *(Potentiation of muscle-stimulants by inhibited Acetylcholin or Potassiumchloride.)*

4. Both these potentiation-phenomena a) the potentiation of Acetylcholine or Potassiumchloride by inhibited muscle-stimulants and b) the potentiation of muscle-stimulants by inhibited Acetylcholine or Potassiumchloride are explained as *results of depolarisation* and *increased permeability* of muscle-cells and muscle-membranes primarily by Acetylcholine and Potassiumchloride with similar though weaker additive effects of the muscle-stimulants *(Potentiation by depolarisation)*.

5. These experiments serve to emphasize the important function of Acetylcholine and Potassium-ions in the *sensitization and contraction* of the isolated inhibited muscle.

Literatur.

[1] Bacq, Z. M.: Arch. internat. Pharmacodynamie **63**, 59 (1939). — [2] Bergmann, F., I. B. Wilson and D. Nachmansohn: Biochem. a. Biophys. Acta N. Y. **6**, 1217 (1950). — J. of Biol. Chem. **186**, 781 (1950). — [3] Bülbring, E., and J. H. Burn: J. of Physiol. **108**, 508 (1949). — Burn, J. H., and J. R. Vane: ibidem **108**, 104 (1949). — [4] Burgen, A. S. V.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 219 (1949). — Burgen, A. S. V., and F. Hobbiger: Brit. J. Pharmacol. **6**, 593 (1951). — [5] Burn, J. H.: Proc. Roy. Soc. Lond. **1950**. — [6] Cicardo, V. H., and J. L. Moglia: Arch. internat. Physiol. **50**, 268 (1940). — [7] Dulière, W., and O. Loewi: Nature (Lond.) **144**, 214 (1939). — [8] Eccles, J. C., B. Katz and S. W. Kuffler: J. Neurophysiol. **4**, 362 (1941). — [9] Feldberg, W.: Verh. dtsch. pharmak. Ges., 17. Tagung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 64 (1951). — Feldberg, W., and R. C. Y. Lin: J. of Physiol. **111**, 96 (1950). — [10] Fenn, W. O., and R. Gerschman: J. Gen. Physiol. **33**, 195 (1950). — [11] Fleckenstein, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 416 (1951). — Hardt, A., u. A. Fleckenstein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 39 (1949). — [12] Fleckenstein, A.: Verh. dtsch. pharmak. Ges., 17. Tagung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 54 (1951). — Fleckenstein, A., H. Hille u. W. E. Adam: Pflügers Arch. **253**, 264 (1951). — [13] Frank, E., Nothmann u. Guttmann: Pflügers Arch. **201**, 569 (1923). — [14] Frank, E., Nothmann u. Wagner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **115**, 55 (1926). — [15] Grant, W. C., and J. C. Krantz jr.: Cancer Res. (Chicago) **2**, 833 (1942). — [16] Grob, D., and A. M. Harvey: Bull. Hopkins Hosp. **84**, 532 (1949). — [17] Harvey, A. M.: Bull. Hopkins Hosp. **65**, 223 (1939).

— [18] Harvey, A. M.: J. of Pharmacol. **68**, 494 (1940). — [19] Hobbiger, F.: Brit. J Pharmacol. **7**, 223 (1952). — [20] Jaco, N. T., and D. R. Wood: J. of Pharmacol. **82**, 63 (1944). — [21] Kuffler, S. W.: J. Neurophysiol. **6**, 99 (1943); **5**, 18 (1942). — [22] Lehnartz, E.: J. of Physiol. **86**, 37 P. (1936). — [23] Lourie and Yorke: Ann. Trop. Med. **31**, 435 (1937). — Lancet **233**, 136 (1937). — [24] Meltzer, S. J., and J. Auer: Amer. J. Physiol. **17**, 313 (1906). — [25] Minot, A. S., K. Dod and S. S. Riven: Science (Lancaster, Pa.) **87**, 34 (1938). — J. Amer. Med. Assoc. **113**, 553 (1939). — [26] Nachmansohn, D.: Modern Trends in Physiol. and Biochem., Woodshole Lectures dedicated to the Memory of Leonor Michaelis edited by E. S. Guzman Barron: 229. Academy Press, Inc. N. Y. 1952. — [27] Naess, K.: Acta physiol. scand. **25**, Suppl. **89** (1951). — Acta pharmac. tox., K'hvn. **8**, 137 (1952). — [28] Nördquist, P.: Acta pharmac. tox., K'hvn. **8**, 195, 183, 207, 226 (1952). — [29] Paton, W. D. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, Art. 3, 347 (1951). — Hunt, C. C., and S. W. Kuffler: J. of Pharmacol. **98**, 96 (1950). — [30] Pick, E. P., et H. L. Holland: Arch. internat. Pharmacodynamie **87**, 377 (1951). — [31] Pick, E. P., et E. J. Tullius: Arch. internat. Pharmacodynamie **84**, 121 (1951). — [32] Randall Lowell, O.: J. of Pharmacol. **105**, 7 (1952). — Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 460 (1951). — [33] Seager, L. D., Austin Smith and Roy Bury: Abstr. Amer. Soc. Pharmac. and Exp. Ther.: J. of Pharmacol. **103**, 361 (1951). — [33a] Shanes, A. M.: J. Gen. Comp. Physiol. **38**, 17 (1951). — [33] Gesler, R. M., and Mihio Matsuba: J. of Pharmacol. **103**, 344 (1951). — [34] Smith, C. M., L. Cohen, E. W. Pelikan and K. R. Unna: J. of Pharmacol. **105**, 391 (1952). — [35] Snapper, I., F. Lieben, E. Greenspan u. B. Schneid: Cancer (Chic.) **4**, 1246 (1951) und J. Labor. a. Clin. Med. **37**, 562 (1951). — Snapper, I., B. Schneid, L. McVay and F. Lieben: Transact. N. Y. Acad. Sci., Ser. II, **14**, 269 (1952). — [36] Staub, H.: Z. klin. Med. **107**, 607 (1928). — [36a] Junkmann, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **122**, 184 (1927). — [37] Unna, K. R., E. W. Pelikan, D. W. MacFarlane, R. J. Cazort, M. S. Sadove, J. T. Nelson and A. P. Drucker: J. of Pharmacol. **98**, 3 (1950); **99**, 215, 226 (1950); **100**, 201, 382 (1950). — [38] Vanremoortere, E.: J. of Pharmacol. **96**, 276 (1949). — Vanremoortere, E., M. Goffart u. Z. M. Bacq: Verh. dtsch. pharmak. Ges., 17. Tagung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 31 (1951). — [39] Wescoe, W. C., and W. F. Riker jr.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 438 (1951).

Prof. Dr. Ernest P. Pick, 19 East, 98th Street, New York 29, N. Y.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 100—115 (1953).

Institut de Thérapeutique Expérimentale de l'Université de Liège.

Action des sels d'alkyl-triméthylammonium sur les muscles normaux et énervés du chat et du chien.

Par

E. Philippot et Marcel J. Dallemagne*.

Avec 10 Figures.

(Eingegangen am 17. März 1953.)

Les propriétés muscariniques des sels d'alkyl-triméthylammonium sont connues depuis les travaux de Külz (1923), de Hunt (1926), de Clark et Raventos (1937), de Raventos (1938) et d'Alles et Knoeffel (1939). En 1943, Ing rappelle les résultats obtenus par Clark et Raventos pour illustrer le principe que des composés chimiques de même structure peuvent exercer des propriétés pharmacologiques différentes. En effet, les homologues inférieurs de la série qui nous occupe (renfermant moins de 7 atomes de carbone dans leur chaîne latérale) exercent une activité muscarinique, alors que les homologues supérieurs entravent, comme l'atropine, l'action des premiers et celle de l'acétylcholine.

Dans le domaine nicotinique, Alles et Knoeffel (1939) opérant sur la pression artérielle du chien, ont complété les recherches entamées par Külz et Achenbach (1923) et par Raventos (1937) qui travaillaient sur l'intestin du rat. La paralysie ganglionnaire que provoquent ces composés a été étudiée sur la chaîne sympathique isolée de l'écrevisse par Schallek, Wiersma et Alles (1948). Quand nous nous sommes intéressés à notre tour aux sels d'alkyl-triméthylammonium, nous avons recherché systématiquement leur action ganglionnaire stimulante et paralysante en opérant sur le sympathique cervical et la membrane nictitante du chat: les homologues inférieurs excitent les synapses ganglionnaires avant de les paralyser, tandis que les homologues supérieurs interrompent d'emblée la conduction au niveau de la jonction synaptique. Cette propriété est particulièrement nette pour les dérivés octyle, décyle et dodécyl-triméthylammonium; elle décroît si la chaîne alkyle s'allonge encore. Les composés de cette série qui sont muscariniques stimulent les ganglions, tandis que ceux qui sont atropiniques les paralysent (Dallemagne et Philippot, 1951).

Ces résultats nous ont conduits à étudier systématiquement l'action des sels d'alkyl-triméthylammonium sur la jonction neuro-musculaire. Au point de vue quantitatif surtout, les résultats obtenus antérieurement sur la grenouille par Külz (1923) et par Ing et Wright (1931) sont très différents de ceux que nous a donnés la préparation nerf sciatique-tibial antérieur du chat.

Ces observations préliminaires nous ont engagés dans une série de recherches qui nous ont permis de constater que les sels d'alkyl-triméthylammonium doivent également être subdivisés en deux groupes

* Dédié au Professeur Otto Loewi à l'occasion de son quatre-vingtième Anniversaire.

en ce qui concerne leur action sur la transmission neuro-musculaire. Les homologues inférieurs sont beaucoup plus actifs que les molécules portant une chaîne alkyle de 8, 10 et 12 atomes de carbone. Nous avons constaté en outre que la différence entre les homologues inférieurs et supérieurs est également d'ordre qualitatif et que leur mode d'action au niveau de la plaque motrice n'est pas le même.

L'ensemble de nos observations déjà publiées (Dallemagne, Gernay et Philippot, 1951; Philippot et Dallemagne, 1951; Dallemagne et Philippot, 1951; Dallemagne, 1952; Philippot et Dallemagne, 1952; Brand, 1952; Dallemagne et Philippot, 1952; Dallemagne et Philippot, 1953) ou encore inédites sont résumées dans la première partie de ce texte. Dans la deuxième partie, nous rapportons les résultats obtenus sur le muscle énervé du chat et du chien, recherches entreprises dans le but d'apporter des éclaircissements aux observations précédentes.

I. Résultats obtenus sur les muscles normaux.

Pour tous nos essais, les chiens sont anesthésiés à la chloralose (90 mgr/Kg) et les chats, indifféremment à la chloralose (90 mgr/Kg) ou au dial (80 mgr/Kg). Dans la plupart de nos expériences, le nerf sciatique est placé sur des électrodes d'argent au niveau de la partie moyenne de la cuisse: les extrémités distales du muscle tibial antérieur et du soléaire sont isolées et sectionnées, puis fixées à des leviers isométriques dont les mouvements sont communiqués au dispositif inscripteur par une transmission à air comportant deux capsules de Marey.

A) Expériences réalisées chez le Chat.

a) Comme type des homologues inférieurs de la série des sels d'alkyl-triméthylammonium, nous choisissons le dérivé amyle parce qu'il est le plus actif. Son mode d'action est d'ailleurs semblable à celui des composés butyle et hexyle.

Il possède plusieurs caractéristiques qui nous permettent de définir son mode d'intervention au niveau de la plaque motrice.

1. Il exerce une action cumulative lorsqu'il est administré à intervalles assez rapprochés,
2. il agit plus intensément sur le tibial antérieur (muscle blanc) que sur le soléaire (muscle rouge),
3. il est antagoniste réciproque du tubocurare,
4. il est très faiblement anticholinestérasique,
5. son action est prolongée par la Neostigmine (Prostigmine) et n'est pas modifiée par l'ésérine,
6. son action est prévenue par l'injection préalable d'une dose moyenne (20 μg/Kg) d'adrénaline: elle n'est pas modifiée ou elle est prolongée si l'adrénaline est administrée pendant l'inhibition,
7. il n'est pas antagoniste des homologues supérieurs de la série.

Ces caractères[1] permettent de classer le composé dans la catégorie des inhibiteurs de la transmission neuro-musculaire agissant par dépolarisation de la plaque motrice et du muscle au sens envisagé par Paton (1949).

[1] L'amyl-triméthylammonium, comme l'acétylcholine, provoque une contracture des muscles de l'oiseau (pigeon et poussin) et du *rectus abdominis* de la grenouille.

b) Les homologues supérieurs de la série des sels d'alkyl-triméthylammonium possèdent les propriétés suivantes:

1. ils ont une action très fugitive, surtout les dérivés en C_8 et C_{10},

2. ils ne manifestent qu'exceptionnellement un effet cumulatif,

3. d'une manière générale, ils agissent également sur le muscle blanc et le muscle rouge,

4. la Prostigmine (100 μg/kg) prolonge l'action de l'octyl-triméthylammonium, modifie peu celle du décyl-triméthylammonium et raccourcit celle du dodécyl-triméthylammonium,

5. l'ésérine ne modifie pas la durée de leur action,

6. le décyl-triméthylammonium provoque une faible dépolarisation du muscle du chat s'il est administré à dose incapable d'inhiber la transmission: cette dépolarisation s'efface si la dose devient plus forte et bloque la jonction (Paton, 1951).

Nous avons émis une hypothèse[1] que nous croyons susceptible d'expliquer ces faits dans une certaine mesure. Ces dérivés possèderaient deux composantes dans leur action, l'une dépolarisante et l'autre curarimimétique ou compétitive qui se développent successivement au niveau de la jonction, l'une apparaissant avec un léger retard par rapport à l'autre et se neutralisant réciproquement.

Pour l'octyle et le décyl-triméthylammonium, la composante acétylcholinomimétique ou dépolarisante apparaitrait la première et ses effets seraient combattus par l'action curarimimétique. C'est l'inverse pour le dodécyl-triméthylammonium. Cette hypothèse n'explique cependant pas la totalité des faits observés et en particulier les effets enregistrés en utilisant le muscle droit abdominal de grenouille[2].

B) Expériences réalisées chez le Chien.

Quand nous avons cherché à reproduire ces expériences sur le chien, nous nous sommes aperçus que l'intervention des composés sur la transmission neuro-musculaire de cet animal accuse des caractères tout à fait différents.

a) Amyl-triméthylammonium.

1. Alors que les doses de tubocurare susceptibles d'inhiber la transmission neuro-musculaire du chien et du chat sont les mêmes (100 μg/Kg pour obtenir un bloc partiel), il n'en est pas ainsi pour l'amyl-triméthylammonium. Les doses équiactives chez le chien sont de l'ordre de 300 à 400 μg/Kg: le chien est donc peu sensible à ce composé[3].

Cette différence de sensibilité est due à ce qu'il intervient chez le chien un élément particulier qui ressort des considérations suivantes,

2. l'amyl-triméthylammonium est un peu plus actif sur le muscle blanc que sur le muscle rouge du chien,

3. la Prostigmine réduit nettement la profondeur et la durée de l'action de l'amyl-triméthylammonium chez le chien, comme c'est le cas pour le tubocurare chez le chien et le chat,

4. l'adrénaline (20 μg/Kg) injectée pendant la période d'inhibition exerce la même influence sur l'amyl-triméthylammonium et le tubocurare: elle réduit nette-

[1] L'octyle et le décyl-triméthylammonium provoquent une contracture des muscles de l'oiseau alors que le dodécyl-triméthylammonium détermine une paralysie flasque.

[2] Les homologues inférieurs de la série des sels d'alkyl-triméthylammonium provoquent une contraction du *rectus abdominis* de la grenouille; l'octyl- et le décyl-triméthylammonium sont pratiquement inactifs (10^{-3}) tandis que le dodécyl-triméthylammonium (10^{-3}) déclenche une contracture.

[3] Le rat est encore moins sensible car 1 mg/Kg n'inhibe guère la transmission nerf sciatique-gastrocnémien de cet animal.

ment la profondeur du bloc neuro-musculaire. Ce fait intervient pour diminuer les effets de l'amyl-triméthylammonium chez le chien: ce composé possède en effet une action nicotinique intense s'il est administré à l'animal atropiné aux doses capables d'exercer un effet sur la transmission; or un des éléments fondamentaux de cette action nicotinique est la stimulation de la jonction entre les nerfs ortho-sympathiques et la médullo-surrénale, ce qui a pour effet une décharge d'adrénaline qui réduit dans une notable proportion l'action de l'amyl-triméthylammonium sur la jonction neuro-musculaire du chien alors qu'elle tend plutôt à l'accentuer chez le chat.

La Dibénamine (Maddock — Dibenzyl-β-chloréthylamine) réduit dans une forte proportion ces effets de l'adrénaline;

5. La répétition des injections d'amyl-triméthylammonium au chien provoque d'abord un effet cumulatif, puis dans certains cas, il apparaît une tachyphylaxie plus ou moins importante. Les modifications du phénomène d'inhibition se marquent parallèlement sur le tibial antérieur et le soléaire. Ces résultats diffèrent de ceux qu'obtient Zaimis (1952) sur le singe et le chien avec l'iodure de décaméthonium: cet auteur observe en effet que l'action de l'inhibiteur sur le muscle blanc devient de moins en moins marquée alors qu'elle s'accentue sur le muscle rouge et en conclut que le produit perd son caractère dépolarisant au fur et à mesure que les injections se répètent, pour acquérir un caractère compétitif chez le chien. Nous ne croyons pas que ce soit le cas pour l'amyl-triméthylammonium.

6. En effet, à la première injection de ce composé chez le chien, la Prostigmine n'additionne pas ses effets dépolarisants comme c'est le cas chez le chat, mais réduit nettement l'inhibition.

7. L'ésérine est antagoniste de l'amyl-triméthylammonium.

Il résulte de ces observations que, contrairement à ce que l'on observe chez le chat, l'amyl-triméthylammonium n'agit pas chez le chien comme s'il était dépolarisant, mais qu'il exerce comme le curare une compétition avec le transmetteur physiologique.

b) Les homologues supérieurs de la série des sels d'alkyl-triméthylammonium possèdent chez le chien les caractères suivants:

1. le chien (3 mg/Kg) est un peu moins sensible que le chat (1 mg/Kg) à l'octyl-triméthylammonium; il est aussi sensible que le chat au décyl-triméthylammonium (2—3 mg/Kg); il est plus sensible (3 mg/Kg) que le chat au dodécyl-triméthyl-ammonium (6 mg/Kg).

2. L'octyl et le décyl-triméthylammonium ne suppriment pas la propriété de l'ésérine et de la Prostigmine de réaliser la potentiation de la contraction du muscle stimulé indirectement. L'action de ces deux dérivés est nettement plus intense chez l'animal dont les cholinestérases sont inhibées.

Le dodécyl-triméthylammonium administré avant la Prostigmine ne permet plus à celle-ci d'augmenter la hauteur du myogramme: en outre, la Prostigmine réduit nettement l'action du dodécyl-triméthylammonium. Il paraît absolument certain que les différences importantes que l'on observe entre l'action de l'amyl-triméthylammonium chez le chien et le chat, tendent à s'effacer quand le groupe amyle est remplacé par ses homologues supérieurs, c'est-à-dire dans le cadre de notre hypothèse, d'autant plus que le caractère curarisant vrai des composés s'affirme avec plus de netteté.

II. Résultats obtenus sur le muscle énervé.

Les recherches relatives à l'action de l'acétylcholine et des inhibiteurs de la transmission neuro-musculaire sur le muscle énervé sont basées sur une ancienne observation de Heidenhain: d'après cet auteur la nicotine provoque une con-

traction des muscles de la langue après dégénérescence du nerf hypoglosse. Cet effet de la nicotine s'accompagne du phénomène de Vulpian et Philippeaux, la contraction pseudomotrice. La réponse à la nicotine du muscle énervé de mammifère est semblable à celle du *rectus abdominis* de grenouille et du muscle de l'oiseau et elle a été étudiée par Langley et par Edmunds et Roth. Riesser (1921) comme Frank, Nothmann et Hirsch-Kaufmann, (1922) s'est intéressé à l'influence de l'acétylcholine sur la même préparation. En fait, l'acétylcholine provoque une contracture du muscle énervé comme le fait la nicotine.

Dale et Gasser (1926) étudient la nature des substances qui déclenchent une contracture du muscle énervé de chat et ils concluent que cette action est caractéristique de l'acétylcholine et d'autres bases quaternaires comme la nitrosocholine, le méthiodate d'hordénine, l'hydrate de tétraméthylammonium, l'hydrate de triméthylsulfonium, la cytisine, etc. Ce sont les composés apparentés pharmacologiquement à la nicotine au point de vue ganglionnaire qui possèdent cette propriété et non les substances parasympathiques.

De ces expériences de Dale, découle le qualificatif de „nicotinique" que l'on applique ordinairement aux effets contracturants de diverses substances sur le muscle énervé de mammifère et sur le muscle normal de la grenouille et de l'oiseau. Gasser et Dale constatent que le curare ne modifie pas l'effet de l'acétylcholine sur le muscle énervé de chat: c'est également le cas pour l'atropine, mais l'adrénaline excerce l'effet remarquable de prévenir et de supprimer cette contracture acétylcholinique; l'ergotamine réduit l'effet de l'adrénaline alors que toute action hypertensive est abolie. Ces auteurs constatent en outre que ces substances nicotiniques rendent le muscle énervé du chat insensible à la stimulation directe, ce qui n'est pas le cas pour le muscle normal de la grenouille et de l'oiseau. Simonart et Simonart (1934) admettent comme très probable que le mécanisme de la contracture du muscle énervé est tout à fait différent de celui de la contraction due à l'acétylcholine: cependant, l'adrénaline supprime aussi bien la contraction du muscle normal que la contracture du muscle énervé. Ces auteurs démontrent en outre, confirmant les résultats de Gasser et Dale, que l'adrénaline n'agit pas en créant une ischémie dans le muscle. Plus tard, Simonart (1935) confirme ses conclusions précédentes. Brown (1938) constate que l'injection intra-artérielle d'acétylcholine provoque une réponse diphasique du muscle énervé de chat; une réponse brève est suivie d'une contracture lente, mais ces deux phases se confondent dans la deuxième si les doses d'acétylcholine sont suffisamment fortes. Cette action de l'acétylcholine est très prolongée, car les potentiels qui sont libérés par l'activité spontanée du muscle énervé s'effacent sous l'influence de l'acétylcholine pendant un temps très long, dépassant notablement la durée de la contracture. Pendant ce «silence musculaire», l'acétylcholine ne provoque plus de réponse diphasique du muscle et seule la contracture lente se développe. Enfin, pendant la contracture, le muscle devient inexcitable de façon directe.

Reid et Vaughan-Williams (1949) constatent que la sensibilité particulière du muscle énervé de chat à l'acétylcholine se développe brusquement le 6e ou 7e jour après la section du sciatique et ils discutent la cause du phénomène, sans d'ailleurs s'échapper du domaine des hypothèses: il ne s'agit probablement ni d'une question de cholinestérases, ni de modifications de perméabilité des membranes.

Opérant sur le soléaire énervé du rat, Jarcho et ses collaborateurs (1950) constatent que contrairement au tubocurare, l'iodure de décaméthonium réduit ou supprime l'excitabilité directe du muscle: cet effet peut être prévenu par l'administration préalable d'une dose suffisante de tubocurare. D'autre part, ces auteurs ont observé que si le muscle du rat n'est pas énervé, il demeure excitable par voie directe pendant l'inhibition de la transmission neuro-musculaire due à l'iodure de

décaméthonium. Ces apparentes contradictions s'expliquent facilement depuis que nous savons que ce composé agit chez le rat et le chien par un mécanisme compétitif alors que ce n'est pas le cas chez le chat. C'est d'ailleurs ce qu'admet Jarcho et ses collaborateurs dans une publication ultérieure (1951).

Zaimis (1951) étudie l'action de l'iodure de décaméthonium sur le muscle énervé du chat et constate que ce composé provoque une contracture du tibial antérieur et réduit dans une forte mesure les réponses à la stimulation directe du muscle. Par conséquent, quoiqu'intervenant par un mécanisme différent sur le muscle normalement innervé du chat et du rat, l'iodure de décaméthonium paraît agir de la même façon sur le muscle énervé de ces animaux: le rôle joué par la plaque motrice paraît donc essentiel pour conditionner chez une espèce animale déterminée le mode d'inhibition de la transmission. C'est ce que nous avons cherché à contrôler en comparant, chez le chien et chez le chat, l'action des homologues inférieurs et supérieurs des sels d'alkyl-triméthylammonium et en observant simultanément leurs effets sur les muscles innervés et énervés.

Méthode.

Le nerf moteur du muscle soléaire de chiens et de chats est sectionné au delà de la subdivision du nerf sciatique 7 à 12 jours avant l'expérience, sous anesthésie à l'éther, en prenant toutes les précautions d'asepsie. Pour l'enregistrement, nous utilisons la méthode décrite plus haut (p. 101).

Une électrode d'argent est enfoncée dans la zone proximale du muscle soléaire: les tendons des muscles superficiels de la loge postérieure de la jambe sont sectionnés et seul le tendon du soléaire est fixé au levier isométrique et relié au deuxième pôle de l'excitateur. Le nerf sciatique et le muscle soléaire sont stimulés 5 fois par minute au moyen de décharges de condensateurs libérées par un dispositif électronique. Deux stimulateurs différents et synchronisés sont utilisés pour l'excitation indirecte et directe et ils fonctionnent alternativement à 6 secondes d'intervalle. Le courant utilisé pour la stimulation directe du soléaire atteint également le muscle tibial antérieur: de la sorte, ce dernier est stimulé alternativement de façon directe et indirecte tandis que le soléaire l'est exclusivement par voie directe.

Cette méthode nous permet de comparer les effets des produits sur le tibial antérieur (stimulé directement) muni de plaques motrices qui interviennent pour une certaine part dans la contraction, sur le soléaire (stimulé directement) dont l'appareil de transmission est dégénéré (les réponses obtenues ne dépendent alors que de l'état du muscle) et sur la jonction neuro-musculaire du tibial antérieur.

De la sorte, nous avons choisi les conditions les plus favorables à l'étude projetée puisque la transmission neuro-musculaire du tibial est particulièrement sensible aux substances dépolarisantes et que le soléaire est le muscle qui accuse les contractures les plus intenses sous leur influence. La pression artérielle qui n'est pas enregistrée au cours de chaque essai pour ne pas surcharger les graphiques, est mesurée par le procédé habituel: les animaux sont héparinés.

Les produits sont injectés par voie intraveineuse et non par voie artérielle pour n'entraver d'aucune façon l'irrigation du muscle: celle-ci ne peut être modifiée que par les effets cardiovasculaires propres des composés.

Dans certains cas, nous stimulons le tibial antérieur par voie indirecte (10 fois par minute) sans exciter le soléaire pour observer exclusivement les effets contracturants sur le muscle énervé.

Résultats.

1. Chez le Chat.

a) Amyl-triméthylammonium. — La figure 1 (A) montre les effets de l'amyl-triméthylammonium sur le tibial antérieur stimulé par l'intermédiaire du nerf alors que le muscle soléaire est laissé au repos.

La première injection d'amyl-triméthylammonium (50 μg/Kg) permet d'observer sur le soléaire l'action diphasique obtenue par BROWN pour l'acétylcholine: une première phase très brève est suivie d'une contrac-

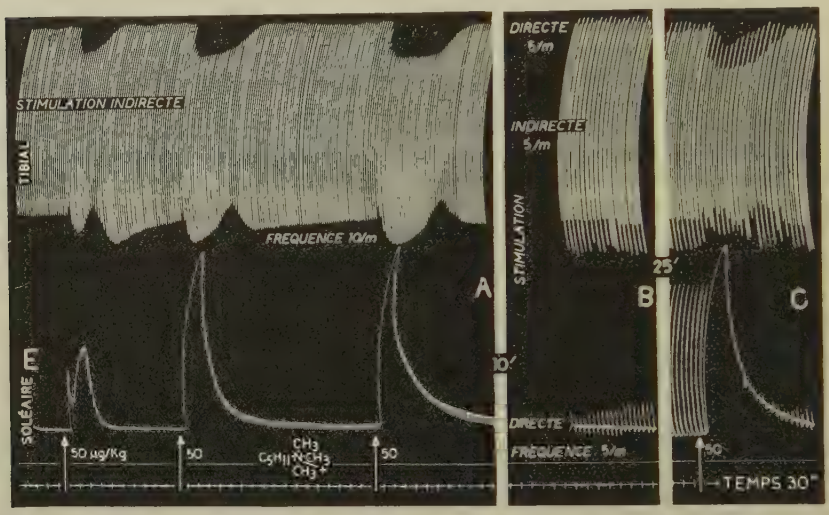


Fig. 1. Chat. En haut: *A* stimulation indirecte du muscle tibial antérieur innervé; *B* et *C* stimulation directe et indirecte alternative du même muscle. — En bas, en *A*, enregistrement du tonus du muscle soléaire énervé, non stimulé; en *B* et en *C*, le muscle soléaire est stimulé directement. En *A* 3 injections intraveineuses successives d'amyl-triméthylammonium (50 μg/kg). — En *C* injection intraveineuse d'amyl-triméthylammonium (50 μg/kg).

ture de plus longue durée. Le tracé du tonus musculaire n'est pas absolument linéaire parce que la stimulation indirecte du tibial l'influence très légèrement de façon purement mécanique.

L'effet de la deuxième injection d'amyl-triméthylammonium est nettement plus vif que celui de la première, quoiqu'il s'agisse de la même dose: déjà, la première phase de la contracture est masquée par la deuxième, plus intense et plus importante quantitativement.

La durée de la contracture correspond approximativement à celle de l'inhibition partielle de la transmission neuro-musculaire au niveau du tibial antérieur.

La 2e partie (B) de la figure permet d'observer les effets de la stimulation directe du soléaire et du tibial antérieur (5 fois par minute) et de la stimulation indirecte du dernier muscle (5 fois par minute). Les

réponses contractiles du tibial antérieur sont absolument normales 10 minutes après la fin du tracé A mais le soléaire énervé ne répond encore que très faiblement à la stimulation directe il ne redevient complètement sensible que 35 minutes après la dernière injection d'amyl-triméthylammonium. En C, une 4ème injection de 50 μg/Kg d'amyl-triméthylammonium provoque une inhibition de 23% environ de la transmission neuro-musculaire et de 15% des effets de la stimulation directe du tibial antérieur. Au niveau du soléaire énervé, il apparaît une contracture semblable à celles observées en A, mais le muscle se montre complètement inexcitable par voie directe pendant cette phase d'hyper-

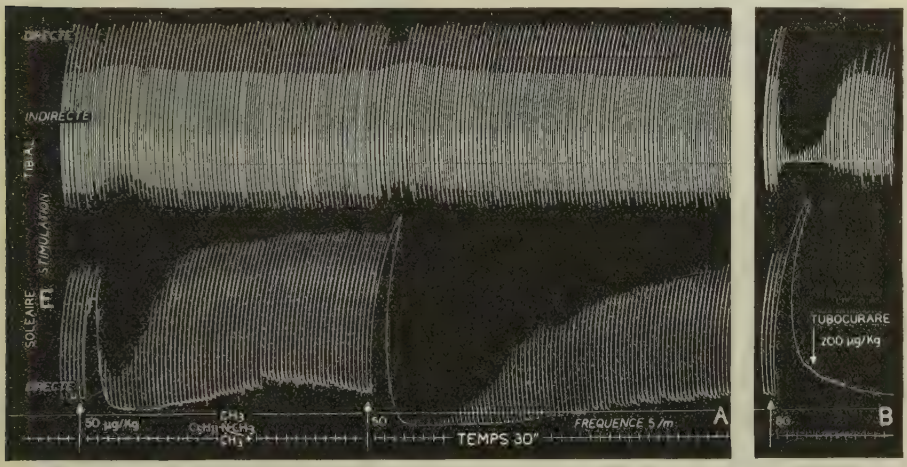


Fig. 2. Chat. En haut, stimulation directe et indirecte alternative du muscle tibial antérieur innervé. — En bas, stimulation directe du muscle soléaire énervé. En *A* deux injections intraveineuses successives d'amyl-triméthylammonium (50μg/kg). En *B* injections intraveineuses successives de 80 μg/kg d'amyl-triméthylammonium et de 200 μg/kg de tubocurare.

tonie: de faibles réponses réapparaissent alors que la tension du muscle tend à revenir à la normale.

Les différences de comportement des deux muscles stimulés directement, vis-à-vis de l'inhibiteur, sont remarquables: la présence de la plaque motrice du tibial empêche ce muscle de se mettre en contracture et réduit notablement les effets du produit sur la contractilité. Comme nous le verrons plus loin pour d'autres produits, la contracture du muscle ne l'empêche pas toujours de se contracter et de répondre à la stimulation directe: contracture et contraction ne s'opposent pas et si les contractions disparaissent, c'est qu'à côté de l'augmentation de tension du muscle qui se marque par un relèvement vif de la ligne de base, l'amyl-triméthylammonium provoque un phénomène surajouté (dépolarisation) qui se traduit par une disparition de la réponse à la stimulation directe.

Cette indépendance de la contracture et de la faculté de se contracter du muscle énervé est bien illustrée par la figure 2 (A). Sous l'influence de 50 μg/Kg d'amyl-triméthylammonium, on observe une légère potentiation de l'effet de la stimulation indirecte du tibial antérieur. L'action du produit sur la stimulation directe du même muscle est très peu marquée, alors qu'elle est intense sur le muscle énervé. Une forte dose du composé administrée en B provoque une inhibition parallèle des effets de la stimulation directe et indirecte du tibial antérieur, alors que le soléaire répond comme précédement: le curare ramène rapidement les contractions du tibial antérieur à leur niveau normal, mais n'agit pas sur le muscle dont les plaques motrices sont dégénérées. La figure 2 (A) permet d'observer en outre que les effets de l'amyl-triméthylammonium sont en réalité triphasiques. La première phase de contracture brève n'est pas visible à cause des contractions dues à la stimulation directe; la deuxième phase est très nette et elle est suivie d'une troisième phase de contracture qui est un phénomène constant et de très longue durée. Celui-ci se déclenche au moment où les réponses à la stimulation directe récupèrent leur amplitude normale; il est généralement plus manifeste lors de la première injection du produit que lors des administrations ultérieures.

b) Octyl-triméthylammonium.

La figure 3 montre l'effet de trois injections successives d'octyl-triméthylammonium. Ce produit provoque une contracture peu intense et passagère du muscle énervé; ses effets sur la stimulation directe de ce dernier sont faibles comparativement à ceux de l'amyl-triméthylammonium; il faut évidemment tenir compte du fait qu'au cours de cet essai l'inhibition des effets de la stimulation indirecte du tibial est de 50 à 75%.

Pour l'octyl-triméthylammonium, il y a un parallélisme étroit entre les effets du composé sur la réponse à la stimulation directe du muscle innervé et ceux que l'on observe sur le muscle énervé, ce qui contraste avec les écarts enregistrés et décrits pour l'amyl-triméthylammonium.

c) Décyl-triméthylammonium.

Plus la longueur de la chaîne alkyle fixée sur le groupe ammonium quaternaire de la molécule s'accroît, plus la contracture du muscle énervé se réduit (figure 4).

Il y a un contraste frappant entre l'action du produit sur les contractions du tibial antérieur provoquées par la stimulation du nerf et celles qui sont dues à l'excitation directe du muscle innervé. Ces dernières ne sont pas plus touchées par le décyl-triméthylammonium que par le tubocurare (à la droite de la figure 4). Les contractions s'inscrivant lors de la stimulation directe du tibial antérieur avant et pendant l'intervention du

produit, accusent une faible différence d'amplitude qui correspond au rôle joué par les plaques motrices dans le processus. Comme le curare, le décyl-triméthylammonium ne modifie donc pas l'excitabilité directe du muscle tibial antérieur encore innervé. Par contre, s'il est énervé, le muscle se laisse déprimer. Tout se passe donc comme si la plaque motrice empêchait le muscle de subir directement l'action du produit et de se laisser dépolariser.

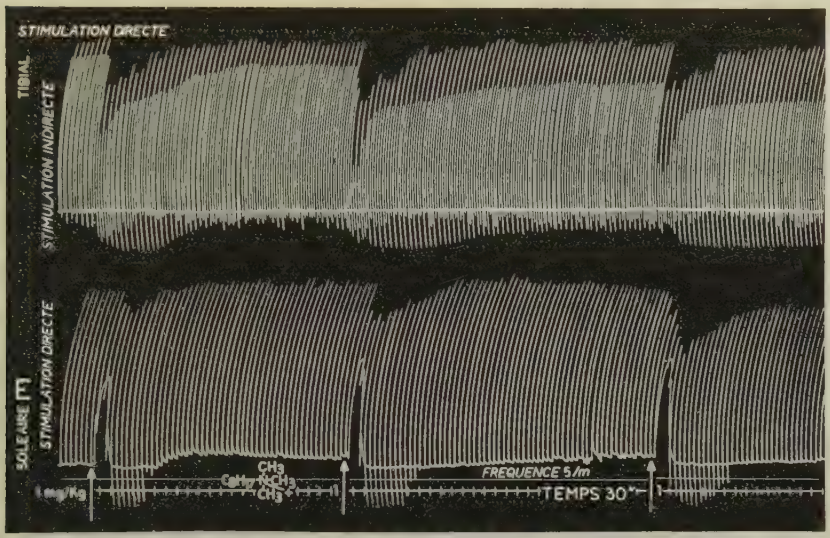


Fig. 3. Chat. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2. Effets de trois injections intraveineuses successives d'octyl-triméthylammonium (1 mg/kg).

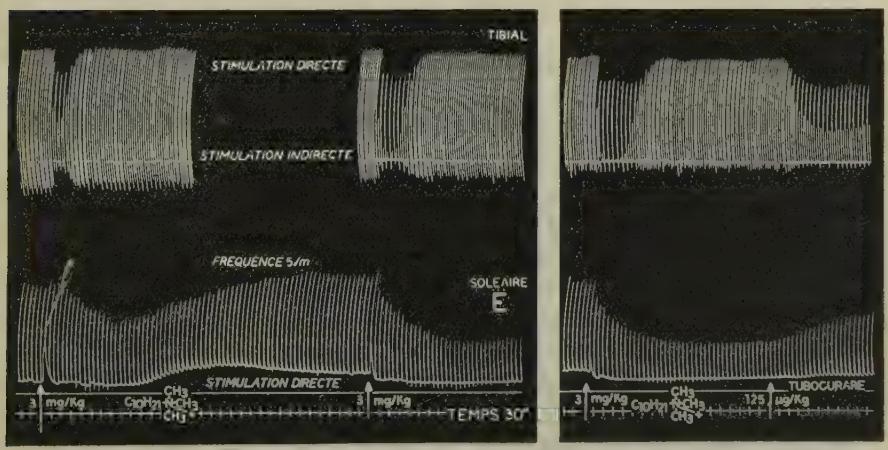


Fig. 4. Chat. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2. Trois injections intraveineuses de décyl-triméthylammonium (3 mg/kg) suivies d'une injection de tubocurare (125 µg/kg).

d) Dodécyl-triméthylammonium.

La figure 5 montre que ce dérivé peut inhiber la transmission neuro-musculaire de façon très importante sans modifier l'excitabilité du muscle innervé ou énervé: les effets de ce produit sur le muscle énervé sont semblables à ceux du tubocurare sauf en ce qu'il provoque une très brève contracture au moment de son injection. L'adrénaline à faible dose libère nettement la transmission neuro-musculaire (tibial) surtout sur le tracé de droite.

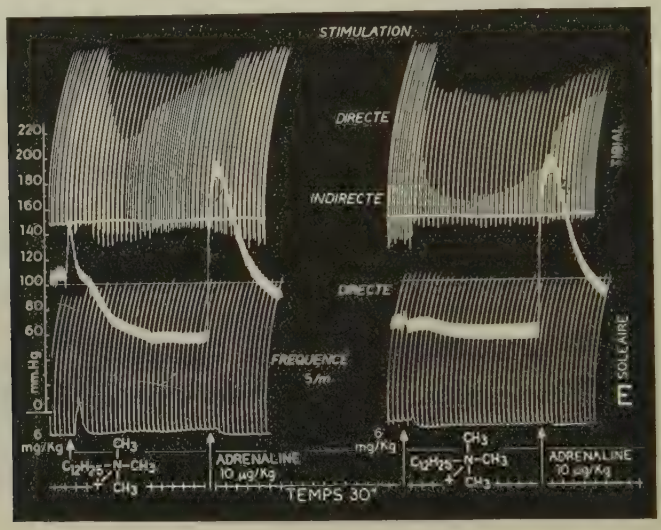


Fig. 5. Chat. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2.: en plus, enregistrement de la pression artérielle. — Deux injections intraveineuses de dodécyl-triméthylammonium (6 mg/kg) suivies d'injections d'adrénaline (10 µg/kg).

e) Iodure de décaméthonium.

A titre de comparaison, la figure 6 indique les effets de l'iodure de décaméthonium. Si l'on devait classer ce produit en comparant la figure 6 aux tracés précédents, on le placerait entre l'octyle et le décyl-triméthylammonium. Il ne provoque qu'une contracture très faible du soléaire: il réduit parallèlement les effets de la stimulation directe du muscle énervé et innervé tout en se montrant très actif sur le mécanisme de transmission. L'injection de tubocurare rétablit très rapidement celui-ci, en accord avec les expériences déjà publiées, mais elle ne modifie guère le tracé du muscle énervé stimulé directement. Une nouvelle administration d'iodure de décaméthonium après celle du tubocurare se montre sans action (B) sur le muscle innervé; ce n'est pas le cas pour le muscle énervé, mais les effets de l'iodure de décaméthonium sont cependant réduits.

2. Chez le Chien.

Il n'y a aucune différence entre le comportement du muscle soléaire énervé du chien et du chat. Les trois phases de la contracture apparaissent régulièrement, surtout pour les produits les plus actifs. L'importance quantitative de la contracture décroît du dérivé en C_5 (fig. 7) à celui en C_{12} (fig. 8), mais pour ce dernier la contracture se marque mieux chez le chien que chez le chat, même pour des doses plus faibles de dodécyl-triméthylammonium. Il faut noter que la répétition des injections de ce dérivé (comme c'est le cas pour le décyl-triméthylammonium) chez le chien et le chat, s'accompagne d'une diminution de la phase de contracture.

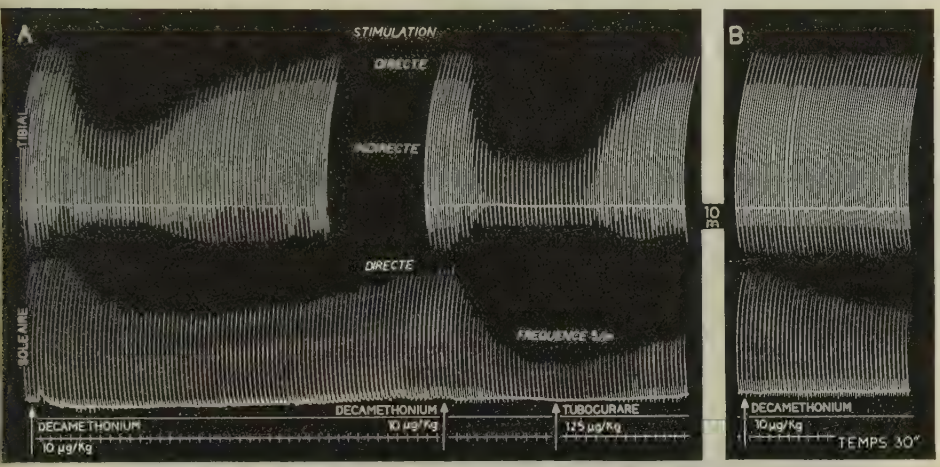


Fig. 6. Chat. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2. Deux injections successives d'iodure de décaméthonium (10 µg/kg); une injection de tubocurare (125 µg/kg), une injection d'iodure de décaméthonium (10 µg/kg).

En ce qui concerne le muscle innervé, il y a une différence importante entre l'action des sels d'alkyl-triméthylammonium chez le chien et le chat. Chez le chien, il y a toujours parallélisme entre les effets de la stimulation directe et indirecte du tibial antérieur. Les plaques motrices du chien ne paraissent pas jouer dans une même mesure le rôle de filtre qu'elles exercent chez le chat. Bien au contraire, la figure 8 montre que l'effet du dodécyl-triméthylammonium est très marqué sur le muscle innervé stimulé directement et indirectement alors qu'il est pratiquement inexistant sur le muscle énervé.

Ces observations ne s'appliquent cependent pas à l'iodure de décaméthonium (fig. 9) qui chez le chien exerce sur le muscle innervé les mêmes effets que le curare chez le chat et le chien; ce composé agit sur le muscle énervé du chien d'une façon plus intense que chez le chat si nous prenons comme point de comparaison le degré d'inhibition de la

transmission neuro-musculaire. Ainsi, l'iodure de décaméthonium inhibe la transmission neuro-musculaire du tibial antérieur, mais ne modifie guère les effets de la stimulation directe de ce muscle, alors qu'il provoque une contracture primaire et secondaire du soléaire énervé en réduisant fortement les contractions dues à la stimulation directe. Contrairement à ce que nous observons chez le chat, le curare agit parfaitement bien sur le muscle innervé du chien (fig. 10) après une injection préalable d'iodure de décaméthonium et son effet est supprimé par l'ésérine; il ne modifie guère l'action inhibitrice que l'injection d'iodure de décaméthonium avait déclenchée sur le muscle énervé de l'animal.

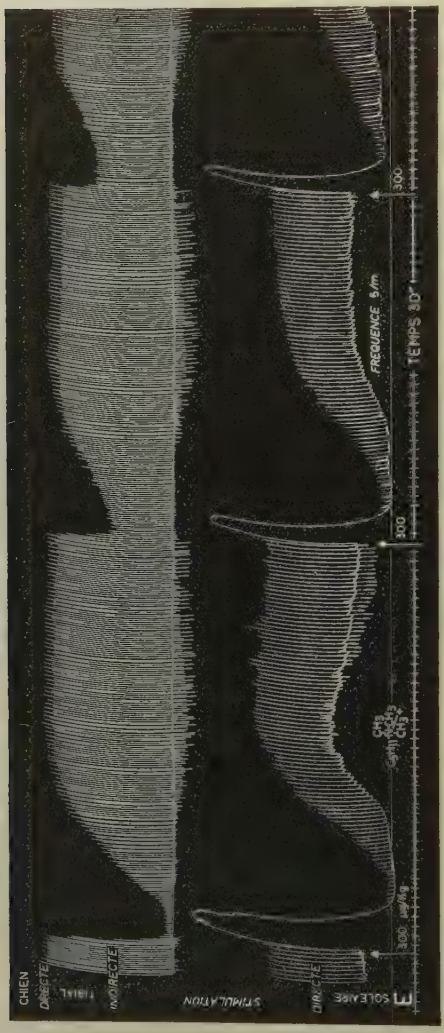


Fig. 7. Chien. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2. Trois injections successives d'amyl-triméthylammonium (300 γ/kg).

Les réactions du chat et du chien vis-à-vis de l'iodure de décaméthonium sont donc très différentes. Chez le chien, ce composé se présente comme le tubocurare en ce qui concerne le muscle innervé, mais il agit sur le muscle énervé du chien comme sur celui du chat. Ces différences dépendent donc du comportement des plaques motrices et non de celui du muscle.

D'autre part, il existe également de grandes différences entre le comportement du muscle innervé du chien vis-à-vis de l'iodure de décaméthonium et de l'amyl-triméthylammonium. Ces produits possèdent les mêmes caractères si on envisage leur action sur la transmission neuromusculaire, mais il n'en est plus de même s'il s'agit du muscle innervé stimulé directement. L'amyl-triméthylammonium déprime l'exci-

tabilité du muscle muni de ses plaques motrices alors que l'iodure de décaméthonium ne la modifie pas.

Enfin, à part la question de la contracture qui est beaucoup plus manifeste pour l'amyl-triméthylammonium que pour l'iodure de déca-

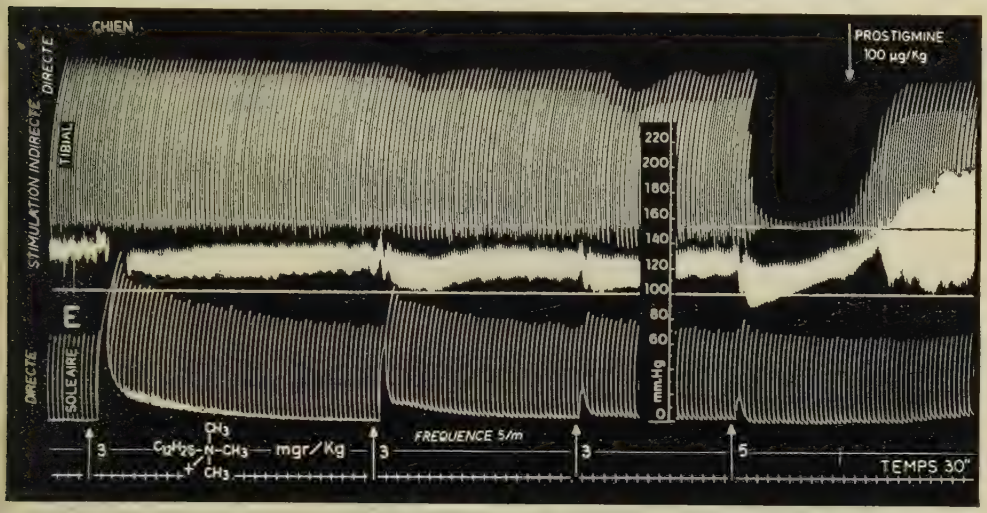


Fig. 8. Chien. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2; en plus, enregistrement de la pression artérielle. Trois injections intraveineuses de 3 mg/kg de dodécyl-triméthylammonium, une de 5 mg/kg du même dérivé, une de Prostigmine (100 µg/kg).

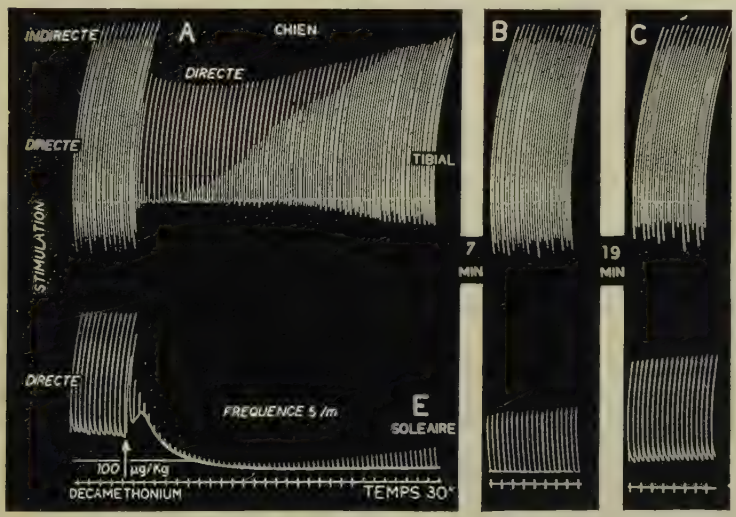


Fig. 9. Chien. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2. Injection intraveineuse de 100 µg/kg d'iodure de décaméthonium.

méthonium aussi bien chez le chien que chez le chat, ces composés agissent de la même façon sur les muscles énervés des deux types d'animaux.

Nous devons en conclure que les muscles énervés du chien et du chat accusent les mêmes propriétés. La différence essentielle entre ces deux espèces animales paraît siéger au niveau des plaques motrices: celles du chat freinent l'action des sels d'alkyl-triméthylammonium sur les muscles innervés, alors que celles du chien exercent plutôt l'effet inverse. C'est le contraire en ce qui concerne l'iodure de décaméthonium.

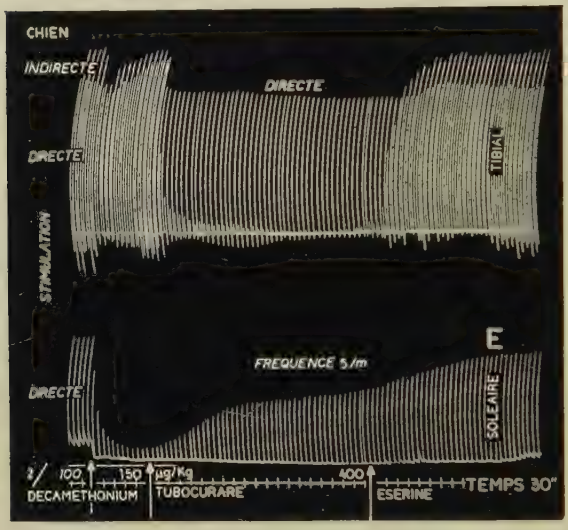


Fig. 10. Chien. Même disposition des tracés qu'à la fig. 2. Injections successives d'iodure de déca méthonium (100 µg/kg), de tubocurare (150 µg/kg), d'ésérine (400 µg/kg).

Conclusions.

Lorsque nous envisageons l'action des sels d'alkyl-triméthylammonium sur le muscle énervé du chat et du chien, nous constatons que plus la chaîne alkyle s'allonge, plus les composés se rapprochent du tubocurare: le dodécyl-triméthylammonium ne provoque guère de contracture et n'altère pas les réponses à la stimulation directe du muscle énervé et innervé, alors que l'amyl-triméthylammonium déclenche une contracture intense et supprime les effets de l'excitation.

Nos résultats mettent particulièrement en évidence les différences qui existent entre l'amyl-triméthylammonium et l'iodure de décaméthonium. Le premier se montre acétylcholinomimétique plus pur que le deuxième, car la contracture qu'il provoque est extrêmement intense et, pendant la phase d'hypertonie, il supprime complètement les contractions du muscle énervé.

Chez le chat, les plaques motrices paraissent jouer le rôle de filtre, empêchant le processus de dépolarisation d'envahir le muscle, si nous sommes autorisés à considérer l'inhibition du muscle stimulé directement comme dépendant exclusivement d'une dépolarisation.

Les résultats obtenus sur le muscle énervé du chien sont très proches de ceux que nous avons enregistrés chez le chat: le soléaire du chien

accuse cependant plus facilement une contracture que celui du chat. En passant du chat au chien et en considérant ce qui se produit au niveau du muscle innervé, nous constatons que le caractère curarimimétique des composés étudiés s'accuse plus nettement; au contraire, en observant le soléaire énervé du chien, nous voyons que les sels d'alkyl-triméthylammonium provoquent une réponse de caractère acétylcholinomimétique plus marqué que chez le chat. Les différences que l'on note entre le type de réaction du muscle innervé du chien et du chat ne dépendent donc que de propriétés appartenant aux plaques motrices.

Nous remercions la Direction des Laboratoires Labaz d'avoir réalisé la synthèse des sels d'alkyl-triméthylammonium que nous avons étudiés et de nous avoir fourni la Tubocurarine Squibb. Nous devons aux Etablissements Allen et Hanburys l'iodure de décaméthonium que nous avons utilisé.

Bibliographie.

Alles, G. A., et P. K. Knoeffel: Univ. California Publ. Pharmacol. **1**, 187 (1939). — Brand, H.: Experientia **8**, 273 (1952). — Brown, G. L.: J. of Physiol. **89**, 438 (1938). — Clark, A. J., et J. Raventos: Quart. J. Exper. Physiol. **26**, 375 (1937). — Dale, H. H., et H. S. Gasser: J. of Pharmacol. **29**, 53 (1926). — Dallemagne, M. J., et E. Philippot: Arch. internat. Pharmacodynamie **87**, 127 (1951). — Dallemagne, M. J., J.-M. Gernay et E. Philippot: Arch. internat. Physiol. **59**, 21 (1951). — Dallemagne, M. J., et E. Philippot: Arch. internat. Physiol. **59**, 374 (1951). — Anesth. et analg., Paris, **9** (suppl.), (1952). — Brit. J. Pharmacol. **7**, 601 (1952). — Arch. Ital. Sci. Farmacol. **3**, 3 1953. — Edmunds, C. W., et G. B. Roth: Amer. J. Physiol. **23**, 28 (1908). — Frank, E., M. Nothmann et H. Hirsch-Kaufmann: Pflügers Arch. **197**, 270 (1922). — Gasser, H. S., et H. H. Dale: J. of Pharmacol. **28**, 287 (1926). — Heidenhain, R.: Arch. f. Physiol. **1883**, suppl., 133. — Hunt, R.: J. of Pharmacol. **28**, 376 (1926). — Ing, H. R., et W. M. Wright: Proc. Roy. Soc. Lond. **109** B, 337 (1931). — Ing, H. R.: Trans. Farad. Soc. **39**, 372 (1943). — Jarcho, L. W., C. Eyzaguirre, S. A. Talbot et J. L. Lilienthal: Amer. J. Physiol. **162**, 475 (1950). — Jarcho, L. W., B. Berman, C. Eyzaguirre et J. L. Lilienthal: Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 33 (1951). — Külz, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **8**, 15 (1878). — Külz, F. et Achenbach, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **100**, 61 (1923). — Langley, J. N.: J. of Physiol. **36**, 351 (1907); **37**, 205 (1908); **39**, 247 (1909); **47**, 159 (1913); **48**, 73 (1914). — Maddock, W. O., V. M. Rankin et W. B. Youmans: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **67**, 151 (1948). — Paton, W. D. M.: J. Pharmacy Pharmacol., London **1**, 273 (1949). — Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 347, 433 (1951). — Philippot, E., et M. J. Dallemagne: Arch. internat. Physiol. **59**, 357 (1951). — Experientia **8**, 273 (1952). — Raventos, J.: Quart. J. Exper. Physiol. **26**, 361, 375 (1937); **27**, 99 (1937). — Reid, G., et E. M. Vaughan-Williams: J. of Physiol. **109**, 25 (1949). — Riesser, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **141**, 342 (1921). — Schallek, W., C. A. Wiersma et G. A. Alles: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **68**, 174 (1948). — Simonart, A., et E. F. Simonart: Arch. internat. Pharmacodynamie **49**, 302 (1934). — Simonart, A.: Arch. internat. Pharmacodynamie **51**, 381 (1935). — Zaimis, E. J.: J. of Physiol. **112**, 176 (1951). — Nature **170**, 617 (1952).

Dr. E. Philippot, Inst. de Thérapeutique Expérimentale de l'Université Liège/Belgien (18, rue de Pitteurs).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 116—135 (1953).

The Wilmer Institute, Johns Hopkins Hospital and University Baltimore, Maryland.

The two Skeletal Nerve-Muscle Systems in Frog* **.

By

STEPHEN W. KUFFLER.

With 9 figures in the text.

(Eingegangen am 16. März 1953.)

OTTO LOEWI has profoundly influenced, directly and indirectly, many fields of physiology. The force and stimulus of his original concepts and investigations has not diminished through the years. The vitality of his ideas is most clearly shown by their wide continued discussion and especially by the fact that they are still put to repeated new experimental tests. This is particularly true for the studies of nerve-muscle transmission processes. The present author had the good fortune of frequent meetings with Professor LOEWI during many pleasant summers at the Woods Hole Marine Biological Laboratories. There, among a new generation of rising scientists LOEWI is at his best spreading his own youthful enthusiasm for the scientific approach to all problems of life. This paper is presented to him, coming from one of many grateful friends.

Only a small aspect of nerve-muscle problems will be discussed here. The main emphasis will be placed on a series of recent investigations which have demonstrated the existence of two functionally distinct systems of nerve-muscle connections. (I) The "Large-Nerve System" or "Twitch System". The first designation emphasizes the neural elements, the second the effector elements. The system consists of nerve fibers of relatively large diameter, conducting at about 8 to 40 m/sec., and of the muscle elements which are innervated by these nerve fibers. This nerve-muscle complex sets up in the normal living animal the well-known muscle twitches which lead to phasic movement. (II) The "Small-Nerve System" or "Slow Muscle Fiber System". This consists of nerve fibers of relatively small diameter, conducting at about 2 to 8 m/sec., and of the muscle fibers in connection with them. This second system leads to relatively slow maintained contractile action, never to muscle twitches or conducted muscle impulses. The "slow" muscle fibers, although skeletal and striated, possess quite distinct properties from the twitch muscle fibers.

* In honor of Prof. O. LOEWI on his 80th birthday.

** This investigation was supported by a research grant from the National Institutes of Health, U. S. Public Health Service.

The differences in innervation patterns, the electrical, pharmacological, and functional properties of the two types of nerve-muscle systems will be discussed. The full evidence for all findings cannot be presented and is found elsewhere. At the outset it is emphasized that strict analogies between frogs and mammals do not seem to exist. A different pattern of organization and of mechanisms has been clearly demonstrated. A recent series of papers has dealt with these questions (Hunt 1; Kuffler and Hunt; Kuffler & Vaughan Williams 1, 2).

A. Differentiation between the Small-Nerve and Large-Nerve Systems.

Differential block of nerve fibers: Tasaki and his collaborators were the first investigators to give clear evidence that stimulation of isolated small diameter motor fibers caused contractile responses which differed from those set up by excitation of the larger nerve fibers. Preferential elimination of fast conducting (and therefore large) nerve fibers can also be obtained by passing an appropriate constant current through the nerve (Kuffler & Gerard). A still simpler and more reliable technique has recently been developed by Kuffler & Vaughan Williams 1. In ventral roots a controlled selective block of different nerve elements was obtained by the use of square pulses. Provided the correct combination of pulse duration (about 0.6—1.0 msec), intensity and interelectrode distance is selected, the faster fibers are blocked at the anode, while the slower ones pass through. In this way practically all the small-nerve fibers to a chosen muscle can be stimulated simultaneously. The present method permits separate and repeated stimulation of different groups of nerve fibers and of their muscle elements.

Contractile responses: Whenever all the motor nerve fibers above a conduction velocity of 8 m/sec. (at about 20—22° C) are blocked, stimulation of the remaining slower fibers causes a typical contractile response of slow time course. An example is shown in Fig. 1. Single stimuli to the small-nerve group innervating the iliofibularis caused only very little tension. At a frequency of 4/sec, however, a slow tension rise, developing over many seconds, can be seen. At higher frequencies the rate of tension rise, recorded isometrically, increases progressively. Almost the same tension peak is reached at all frequencies above 40/sec. The gradual tension build-up is a characteristic phenomenon when small-nerve fibers, conducting at about 2—8 m/sec, are stimulated. Complete relaxation (not shown in Fig. 1) may take seconds or minutes, depending on recording conditions.

In contrast, a single stimulus to the large motor nerve fibers, conducting at 8—40 m/sec, causes the well known twitch response which in a sartorius at 20—24° C may rise to a peak in 20—30 msec. and relax within 0.1 seconds. Twitches also sum, but having a relatively short

contraction time, high frequencies are needed to produce a smooth, fused tetanus.

The mechanical response differences alone are so striking that a ready distinction can be made between the two nerve-muscle systems. The separate function of certain motor nerve fibers is clearly indicated by these experiments (see also below).

Differentiation of individual slow muscle fibers and twitch fibers: It became important to dertermine whether distinct groups of muscle fibers responded to stimulation of small and large-nerve fibers. Although indirect evidence for two different striated muscle fiber groups was

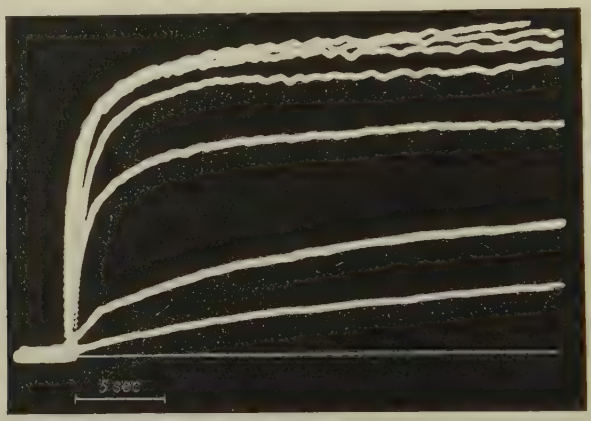


Fig. 1. The contractile effect of small-nerve stimulation at various frequencies. Isometric tensions, set up in slow muscle fibers in the iliofibularis by small-nerve stimulation at frequencies of 4, 10, 20, 30, 40, 50 and 75 per second, maintained for the duration of the sweep. No twitch motor unit activity present. All seven exposures superimposed on one record. At the three highest frequencies the final tension was similar but the rate of rise differed. Maximum tension 2 g. Initial tension 0.5 g. Tension recorded by a transducer coupled to a D.C. amplifier, base line drawn in. (from Kuffler & Vaughan Williams[3]).

available from several sources, it remained possible that individual muscle fibers had a dual role, namely of slow or fast contractile action, depending on the nerve fiber type through which they were excited. In fact, that was the prevalent explanation for the well known "tonic" phenomena which have been seen by many workers (see reviews by Brecht, and Krüger). Experiments with intracellular recording electrodes have now clearly established that different muscle fibers are involved in the small-nerve and large-nerve response. Electrodes placed within a cell record only the activity of that cell, and are hardly affected by simultaneous activity of surrounding tissues.

Fig. 2 illustrates the two main response types which can be obtained from numerous frog muscles. In Fig. 2a the microelectrode was inserted into a muscle fiber which had a membrane potential of 90 mV. When

the nerve to the iliofibularis was excited a large 120 mV potential resulted. This is the action potential associated with muscle twitches, as already shown by NASTUK & HODGKIN. It is analogous in many respects to the nerve impulse and shows the "overshoot" or potential reversal phenomenon, i. e. the spike exceeds the membrane potential. Furthermore, the action potential propagates along the whole length of a muscle fiber and apparently activates the contractile elements as it sweeps along the fiber surface. Fig. 2b shows the second principal response type which is always small (8—15 mV) and has a slower and more complex time course (note the slow sweep speed) than the propagated muscle impulse. Its characteristics will be discussed in detail below. It has been named the "Small-Nerve Junctional Potential" or s. j. p. in former studies (KUFFLER & GERARD).

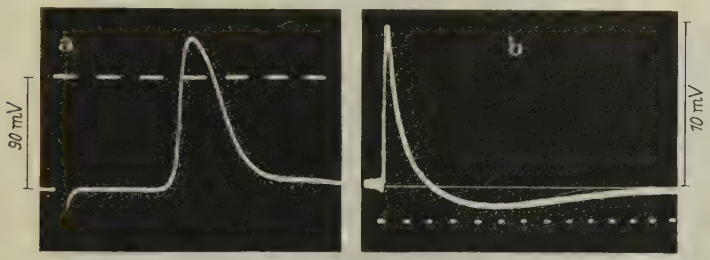


Fig. 2. Response types from frog muscles with intracellular recording. *a.* Electrode inserted into a twitch muscle fiber of iliofibularis. Resting potential difference between inside and outside 90 mV. Zero membrane potential indicated by upper sweep interrupted at 1000 c.p.s. Maximal nerve stimulation causes a propagating muscle impulse of 120 mV, i.e. 30 mV in excess of membrane potential. *b.* Electrode in slow muscle fiber, resting potential 52 mV, zero potential not shown. Typical response following small-nerve stimulation, called small-nerve junctional potential (s.j.p.). Potential peak is only 10 mV. Note the large hyperpolarization or "positive afterpotential" and slow time course. For details of rising phase of s.j.p. see Fig. 3. Time marker 50 c.p.s., base line added (modified from KUFFLER & VAUGHAN WILLIAMS[1]).

Individual muscle fibers gave either s. j. p.'s or conducted impulses, never both. Further, it was found that the propagated impulse type was always associated with stimulation of large diameter nerve fibers, while small-nerve stimulation alone caused the distinctive s. j. p.'s of Fig. 2b. *Therefore it seems established that no individual muscle fiber receives both kinds of innervation or gives both types of response.* There exist then two different systems of nerve muscle connections involving different groups of muscle fibers, namely the twitch fibers and "slow" muscle fibers.

B. Innervation Pattern of Frog Muscles.

Multiple innervation of individual slow muscle fibers: By stimulating one or a few small-nerve fibers it was shown by KUFFLER & GERARD that the potentials which set up s. j. p.'s were confined to the nerve-muscle junctions and their spread was electrotonic over several millimeters around the endplate regions. In recent studies, when the majority of small-

nerve fibers to muscles could be excited, it was found that s. j. p.'s were recorded anywhere along the course of slow muscle fibers if microelectrodes were suitably inserted. This fact alone led to the conclusion that slow muscle fibers are densely innervated.

A close examination of s. j. p.'s, of the type seen in Fig. 2b, gave more details about the innervation density and furnished good evidence that these potentials are complex in nature and at any point are caused by the activity of several small-nerve fibers. Fig. 3, taken from a recent

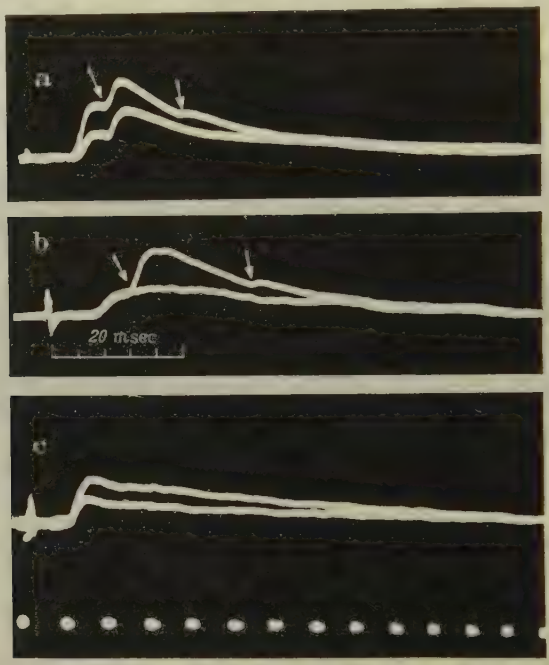


Fig. 3. Multiple terminations on single slow muscle fibers. Faster sweep than Fig. 2b; early phase only of s.j.p. is shown. Intracellular records from three different slow muscle fibers in iliofibularis. Graded stimulus strength to small-nerve fibers in ventral root brings in additional "steps". In each record two sweeps superimposed, s.j.p. components (arrows) are set up by different small-nerve axons with junctions in vicinity of electrode tip. Time marker in *c* 100 c.p.s.; s.j.p. peaks 8 to 11 mV. Hyperpolarization phase of s.j.p.'s seen on slower sweep only (from KUFFLER & VAUGHAN WILLIAMS[1]).

study, shows the early phase of s. j. p.'s when the stimulus to small-nerve fibers to the iliofibularis was graded. Gradual increments of stimulus strength excited more and more small-nerve fibers and at the same time new discrete components were added to the s. j. p.'s. In Fig. 3 two sweeps were superimposed in each record at two different strengths of a stimulus to ventral root 10. The simplest and smallest potential is obtained at threshold intensity (e. g. lower tracing in Fig. 3b and c), set up by a small-nerve axon(s) of relatively low threshold. As many as

seven distinct steps have occassionally been seen in one s. j. p. with finely graded stimulation. In Fig. 3 some of the s. j. p. steps marked by arrows are set up by small-nerve fibers of different conduction velocities. The later steps are generally brought in by stronger stimuli and are therefore caused by relatively high threshold fibers of slow conduction speed. Since s. j. p.'s spread only electrotonically and are not propagated and since the recording range of an intracellular electrode under present conditions seems limited to a few millimeters, it is concluded that many small-nerve junctions exist along a short stretch of slow muscle fibers. Further, the finding that s. j. p.'s are recorded along the whole course of slow muscle fibers indicates that the dense innervation covers the entire fiber length.

Twitch muscle fiber innervation: As early as 1885 SANDMANN presented histological evidence that individual muscle fibers in the sartorius can have several endplates along their course. Physiological evidence for multiple terminations on individual muscle fibers was given by KATZ & KUFFLER for the sartorius, which is practically a pure twitch muscle with a predominant large-nerve innervation. Recently multiple innervation of individual twitch muscle fibers was also demonstrated in several other frog muscles and in cat (HUNT & KUFFLER). With intracellular electrodes inserted into single muscle fibers portions of the motor nerve supply to the muscles were stimulated. It was shown that one muscle fiber can carry propagated impulses arising at different junctions along its course. In the experiment of Fig. 4 the divided pelvic and tibial branches of the sartorius were excited separately, each setting up a propagated impulse (and twitch) in the same fiber. The latency of the impulses is different, mainly due to the varying conduction distance between the endplates and the intracellular electrode. When both branches were excited simultaneously, only the muscle impulse with the shorter latent period, from the nearest endplate, reached the electrode. The other impulse was extinguished by "collision".

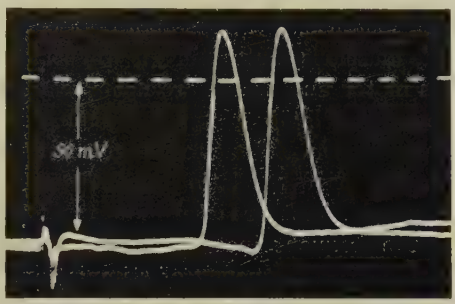


Fig. 4. Multiple innervation of twitch fibers. Intracellular recording from a muscle fiber in the sartorius. Two exposures superimposed with separate stimulation of the tibial and pelvic branch of the nerve to the muscle. Both branches set up a propagated impulse in the same fiber. Note different latencies due to difference in conduction distance between electrode and the nearest endplate of the tibial and pelvic branch. With simultaneous stimulation of both branches only the impulse of shorter latency is seen. Resting potential 90 mV, upper sweep indicates zero potential modulated at 1000 c.p.s. (from HUNT & KUFFLER).

These studies show once more the multiple innervation of individual twitch fibers in many muscles. In these fibers, however, there certainly

exist relatively long nerve free stretches, in contrast to the innervation of slow muscle fibers.

The motor unit: A motor horn cell with its nerve fiber and all the muscle elements which it innervates is the motor unit according to a purely structural definition. Gradation of muscle movement and of tension is brought about principally by motor unit recruitment. Functionally, as judged by contractile performance, the individual motor unit is not always a well defined entity. Not all the muscle fibers "belonging" to a motor unit need contract with each motor nerve impulse, and not all muscle fibers contract fully. The following phenomena should be considered in this context. If one muscle fiber is innervated by more than one nerve fiber it will be shared by more than one motor unit. This is true for many twitch fibers and for all slow muscle fibers. A motor unit overlap can therefore occur when many units contract simultaneously. For instance, if a large-nerve motor axon is excited while a great part of the muscle is contracting, it will set up activity only in those portions of its motor unit which are not already being stimulated. By contracting fewer muscle fibers one axon then will cause the addition of less tension than it would if excited singly. Multiple innervation will thereby affect the fineness of gradation depending on contractile background activity in a muscle. Another factor in normal twitch-motor unit activity of the frog is the frequent incompleteness of transmission. Depending on muscle stretch and frequency of stimulation, fewer or more muscle fibers take part in the activity of one motor unit (Kuffler 2; Libet & Wright). No local graded contractions are, however, known to occur normally in twitch fibers on nerve stimulation.

The effect of multiple innervation of slow muscle fibers on their contractile output is more complex than in twitch fibers. In the latter the whole muscle fiber always gives a propagated impulse and a maximal twitch, whether excited through one or more endplates. The slow muscle fibers, however, are excited merely around the small-nerve junctions, giving local electrical and contractile changes. The more local areas, distributed along the length of a slow muscle fiber, become involved, the stronger it will contract. Each slow muscle element, therefore, having a multiaxonal innervation, belongs to numerous motor units. Furthermore, the extent of local changes also depends on the frequency of stimulation which contributes to the very fine gradation of which a slow muscle fiber is capable (see later).

C. Specific Properties of Slow and Twitch Fibers.

Membrane potentials: Under favourable experimental conditions, for instance in a sartorius muscle, a resting potential of over 90 mV is measured between the inside and outside of twitch muscle fibers (Ling

& Gerard). In slow muscle fibers the membrane potential has always been found to be lower, usually around 60 mV in selected measurements (solid squares Fig. 5 A). The fact that resting potentials fall into two groups emerges clearly from this diagram. While there are certain difficulties in measuring intracellular potentials in slow muscle fibers the results were consistent in all experiments (for details see original paper).

Junctional potentials: There exist striking differences between endplate potentials (e. p. p.'s) at the junctions of twitch fibers and large-nerve fibers, and the s. j. p.'s at small-nerve junctions. E. p. p.'s usually rise to 30—40 mV before setting up a propagating muscle impulse and their subsequent time course is largely obscured by the spike. In curarized,

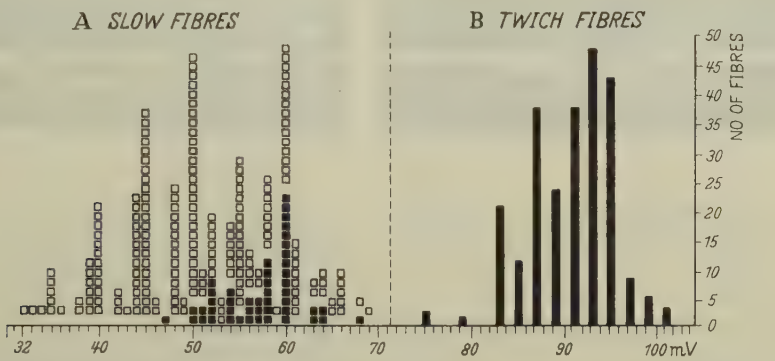


Fig. 5. *A* Resting potentials of 244 slow muscle fibers of iliofibularis. Open squares represent unselected potentials, solid squares are measurements selected according to certain rigid criteria. Note absence of potentials above 70 mV. *B* Resting potentials from 239 twitch fibers in the sartorius. Distribution peak over 90 mV. (from Kuffler & Vaughan Williams[1]).

fatigued or even normal junctions (Kuffler 2) e. p. p.'s can be studied uncomplicated by spikes. The most recent and accurate study of the e. p. p.'s and of junction processes was made by Fatt & Katz. In short, the e. p. p. may be regarded as a depolarization which rises to a peak in 1—1.5 msec. and declines to the base line in about 30 msec. along an exponential time course. In contrast, the s. j. p. does not exceed 15 mV, does not set up propagating impulses and its declining or restorative phase is complex and slow. The s. j. p. consists of: (I) a rapid depolarization, made up of several steps (Fig. 3) which in a synchronous s. j. p. may have a rise time of 2—3 msec. (II) a repolarization phase which is approximately exponential but always swings over into a hyperpolarization. The latter may be 20—40% of the initial depolarization. (III) a final restoration, or return to the original membrane potential. The whole s. j. p. complex may last for 0.4 seconds.

Some additional characteristics of s. j. p.'s and of slow muscle fibers become apparent during repeated stimulation. Even at high frequencies

the slow muscle fibers cannot be depolarized much over 30—35 mV. An equilibrium between the depolarizing and restorative processes is soon reached. The contribution of individual s. j. p.'s during trains of small-nerve stimuli has recently been analyzed. Fig. 6a is an intracellular record from a slow muscle fiber made up of three separate but superimposed exposures of one, two and three nerve volleys at 15 msec. intervals. The height and time course of the second s. j. p. was derived by subtracting the first potential from the combined potential set up by two nerve volleys, while the third potential is given by the difference between two and three s. j. p.'s. The individual potentials are then plotted separately

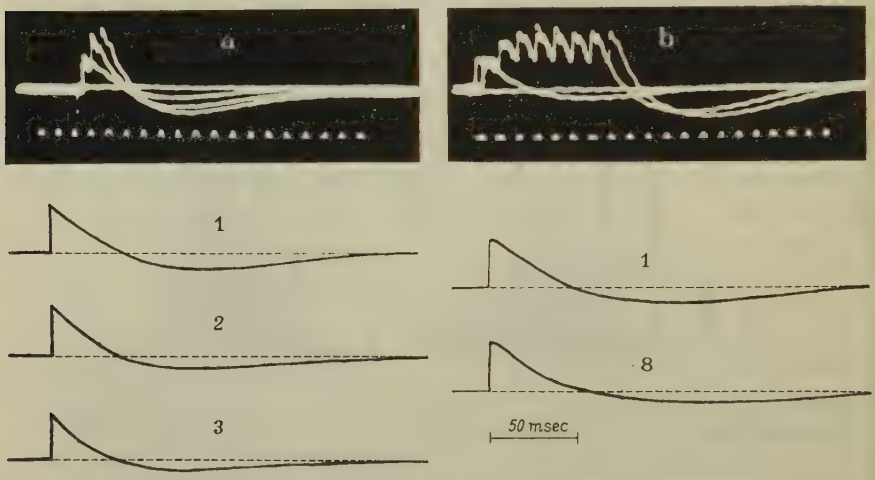


Fig. 6. Intracellular recording from slow muscle fibers in the iliofibularis during repeated stimulation of small-nerve fibers within the 10th ventral root. The membrane potential was 50 and 53 mV in the two fibers, the single s.j.p. 9 mV in both. Time base in upper records 50 c.p.s. *a* Three sweeps superimposed giving one, two and three nerve stimuli; intervals between shocks are 15 msec. Below are plotted in sequence from above the single s.j.p., and the contributions of the second and third nerve volleys, the latter two derived by subtraction (see text). – *b* Three superimposed sweeps with one, seven and eight stimuli. Intervals 20 msec. The single s.j.p. starts earlier and does not coincide with the first s.j.p.'s of the two series at 50/sec. Below are plotted the single s.j.p. and the contribution of the 8th nerve volley, which is the difference between the potential set up by 7 and 8 stimuli. Note the accurate superposition of the two tetani.
(from Kuffler & VaughanWilliams[1]).

below, for better comparison. In Fig. 6b a tetanus of 7 and 8 stimuli at 50/sec. has been superimposed and the difference between these constitutes the contribution of the 8th small-nerve volley. This again is plotted below for comparison with a single s. j. p. It appears that even during relatively intense activity, as during a depolarization plateau, the successive s. j. p.'s are not greatly changed. It was concluded from such results that the initial event in slow muscle fibers is a short depolarization which in turn initiates a series of processes which are determined by the slow fiber characteristics. The stability of the restorative processes (re-

polarization and hyperpolarization) even during continued activity, indicates that the electrical characteristics of the muscle fiber are not greatly changed by stimulation.

"Electrical" and "chemical" properties: Several muscles, such as the sartorius or adductor longus, do not contain a significant number of slow fibers. In others the slow muscle fibers (and small-nerve innervation) are confined to distinct regions, for instance in the iliofibularis or semitendinosus. Such muscles can be divided into "twitch portions" and "slow portions". The latter, however, always contain a mixed population of slow and twitch fibers. Either whole twitch muscles or twitch portions can be taken for experimentation and their

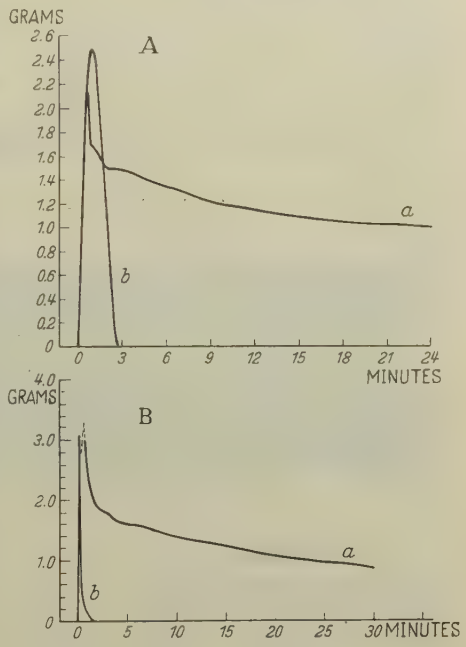


Fig. 7. Isometrically recorded tensions during chemical and electrical excitation of slow and twitch fibers. *Aa* Slow portion of the iliofibularis immersed into 10^{-5} ACh. Within the first minute there occured noticeable transient propagated twitch fiber activity, followed by a gradual tension decline. Initial tension 0.5 g. *Ab* Adductor longus in isotonic KCl develops transient tension rise only. Initial tension 1.0 g. *Ba* Slow iliofibularis portion during constant current flow of 50 μA maintained some tension for 30 minutes. Initial tension 0.5 g. *Bb* Current of 180 μA passed through adductor longus sets up transient tension rise only. Initial tension 1.0 g. Twitch portion of iliofibularis gave similar tension curves as the adductor longus. Large tensions which occur during the first 30 seconds of drug action or of current flow, are not plotted (from Kuffler & Vaughan Williams[2]).

behaviour compared with parts containing slow muscle elements. The following results have regularly been obtained (I) Strong electric shocks of short duration applied "directly" to large-nerve innervated muscles cause twitches only, while similar stimuli to small-nerve innervated muscles are followed by long maintained shortening or tension changes. (II) Constant current passed through twitch muscle fibers will produce a tetanus, followed by a transient cathodal contracture, lasting 2 minutes or less although current flow is maintained. The same current causes prolonged (up to 60 minutes) contractile changes in slow muscle fibers. (III) Depolarizing agents, e. g. KCl or Acetylcholine (ACh) act on twitch fibers and on slow fibers in a similar manner to constant current.

Two examples are shown in Fig. 7. The slow portion of the iliofibularis was immersed in 10^{-5} ACh and the tension development was

recorded isometrically (Fig. 7 Aa). The quick initial tension development is due to asynchronous twitches and declines rapidly while the remaining tension has a slow time course and is still appreciably present after 24 minutes. If either the twitch portion of the iliofibularis or a whole twitch muscle is immersed into ACh the tension change is transient, resembling that in Fig. 7 Ab. This record was in fact obtained from an adductor muscle immersed in isotonic KCl solution, but a strong ACh solution would have caused a similar effect. Although such solutions depolarize the muscle rapidly, they do not cause a maintained tension and in spite of the continued presence of KCl, relaxation has taken place within 3 minutes. In Fig. 7 Ba a constant current of 50 μ A was passed through the slow portion of an iliofibularis for 30 minutes, causing maintained tension. 180 μ A passed through the adductor longus in Fig. 7 Bb, however, ceased to be effective after less than 2 minutes, although current flow was kept constant.

Experiments of this kind have led to the conclusion that important differences exist between twitch and slow muscle fibers in their contractile response to long lasting stimuli which may be either constant currents or depolarizing drugs. These phenomena are well known and have been established especially by Sommerkamp, Wachholder and von Ledebur, Wachholder and Nothmann. The present series of investigations merely correlate them with the small-nerve innervation and slow muscle fibers (see General Comment).

D. Reflex Activation of the Small-Nerve System: Interaction of Twitch and Slow Fibers.

In a decapitated frog "at rest", without obvious visible contractile activity, one can usually record s. j. p.'s from the surface of many muscles. These potentials are set up reflexly and can be enhanced or inhibited by afferent nerve impulses arising in the periphery. Whenever the frog executes a visible movement there appear large propagating impulses in twitch muscle fibers which to a large extent obscure the smaller s. j. p.'s in the slow fibers.

A certain amount of separation in the reflex activation of the two systems can be shown simply by touching the frog's skin while recording from some muscles which receive small-nerve innervation. It is thus frequently seen that small-nerve discharges have a relatively low reflex threshold (not electrical threshold), i. e. they are activated in great numbers by "gentle" touch, while stronger pressure is needed to cause twitch reflexes. While such stimulation presumably sets up an afferent discharge pattern which resembles that during normal activity, electrical stimulation of afferent pathways in skin and muscle nerves leads to a more artificial but better controlled reflex activation. By electrically exciting

the central ends of cut nerves one can set up reflex contractions of appreciable magnitude in slow muscle elements, without bringing in twitch discharges. The latter appear, however, when the afferent volleys reach a certain strength or frequency.

An example is shown in Fig. 8 giving the tension development and also the electrical discharge pattern during such a reflex. In this experiment stimulation at 20/sec. to the central end of the cut tibial nerve caused s. j. p. reflexes (b) and the associated slow muscle tension (a) seen

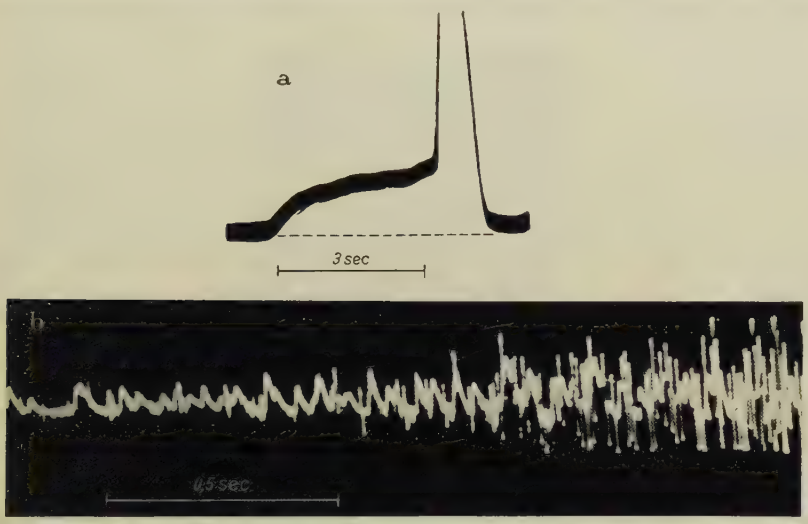


Fig. 8. Reflex excitation of the small-nerve and large-nerve systems in a spinal frog. Tension and electrical discharges recorded from partially isolated ventral head of the semitendinosus. The central end of the cut tibial nerve was stimulated submaximally at 20/sec. *a* For about 3 seconds the reflex activity was exclusively in small-nerve fibers causing a slow tension rise. A slight increase in the stimulus strength set up a sudden burst of twitch reflexes, accompanied by a quick tension rise (tension peak off the record). Reflex stimulation discontinued shortly after twitches started. *b* Electrical activity which accompanies slow tension shows s.j.p.'s only, while during the twitch reflex propagating muscle impulses are seen. Note faster time scale in *b* which illustrates early phase only of twitch reflexes and the s.j.p.'s immediately preceding them (from KUFFLER, LAPORTE & RANSMEIER).

in the first portion of the records. An increase in the strength of the afferent stimuli set up a sudden burst of twitch reflexes in addition to the s. j. p.'s.

Although the above experiments do not furnish detailed information of spinal organization, they indicate that small-nerve reflexes utilize some mechanism which are distinct from the twitch reflexes. On the whole the discharges seem to be distinguished by their more continuous and maintained nature, besides being set up more readily by a variety of stimuli. They are, however, subject to excitation and inhibition in a similar manner to twitch reflexes and are seen to be coupled with them during light twitch contractions. During more synchronous twitches

they cannot be detected, and are probably obscured by the larger propagated impulses.

In isolated nerve-muscle preparations some aspects of the mechanism of interaction between the two fiber types could be tested more satisfactorily. If twitches are added to slow muscle fiber contractions, the tensions sum, as expected from the existence of two separate systems. There do occur, however, some other interactions of possible interest. In Fig. 9a a series of twitches (tension peak off the record) were superimposed on a small-nerve tetanus and at the end of the twitches the

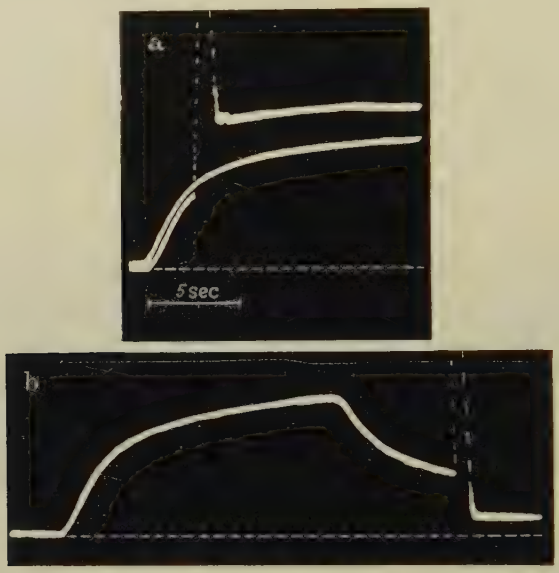


Fig. 9. Interaction between slow and twitch fibers in the isolated iliofibularis. *a* Two tension records superimposed. Small-nerve stimulation at 30/sec. causes a slow smooth tension rise reaching peak value of 0.6 g. In the second superimposed exposure a short burst of twitch fiber activity is added (tension off the screen) during continued small-nerve stimulation. After the tetanus the slow muscle fiber activity maintains a higher final tension value (0.75 g.) than it would have reached without the interposed twitch tetanus. *b* Small-nerve stimulation at 30/sec. sets up tension of 0.8 g. in 20 seconds. During slow relaxation following cessation of small-nerve excitation a short tetanus in twitch fibers causes a collapse of most of the residual tension. Initial tension 0.5 g in *a* and *b*. (from KUFFLER & VAUGHAN WILLIAMS[2]).

slow muscle fibers maintained a greater tension than they could have developed alone. While such tension synergism is seen when both nerve-muscle systems are simultaneously active, the opposite effect can also be demonstrated in Fig. 9b, namely twitch activity accelerating the tension decline *after* slow muscle fiber activity. A tension residue, subsiding very slowly, is usually seen after cessation of small-nerve activity. Such a tension can be partially or completely collapsed by interposition of twitches (Fig. 9b). Since residual slow muscle tension is also abolished by stretch, this interaction phenomenon seems purely "mechanical" and

like all other tension effects it is greatly influenced by initial muscle tension. It is not known whether these types of interaction play a significant role in the intact animal.

General Comment.

A great part of the experimental evidence presented here has been known for a long time, stemming from many sources. In the first place the important early studies of SOMMERKAMP on "tonic" muscles should be mentioned. He established clearly that portions of the iliofibularis showed distinct contractile behaviour in response to "chemical", "electrical" and other forms of stimuli. On the whole his views have been strikingly confirmed, but he thought that "tonic" muscle fibers could give twitch responses in addition to the slow maintained contractions. This was, and still is, a widely held view. SOMMERKAMP's "Tonusbündel" is the region in the iliofibularis where the slow muscle fibers are located and there seems little doubt that his "tonic" elements have now been identified with the intracellular recording method. These studies have also shown physiologically that small-nerve fibers supply only the "Tonusbündel" but not the twitch portion of the iliofibularis, a finding which has histological support (GÜNTHER). The numerous studies of WACHHOLDER and his coworkers on the "tonus" problem appear also to have been done on the slow muscle fiber system. More recently BRECHT and FENEIS have come to doubt the validity of available evidence for special contractile properties of different muscle fibers, as a result of experiments with ACh immersed preparations. In a later study BRECHT and EPPLE, however, postulate the existence of different fiber types, those where ACh depolarizes the endplates only and sets up twitches (e.g. sartorius fibers), and fibers where the depolarization spreads over the whole surface and causes slow contractile changes (some fibers in the rectus abdominis). The present findings are in essential agreement with these conclusions. If one assumes that ACh acts at small-nerve junctions, practically the whole fiber surface would be involved by the depolarization.

Detection of slow muscle fibers by their reaction to ACh alone may not always be sufficient since the sensitivity even of twitch muscles is variable (WACHHOLDER and NOTHMANN). This, in fact, led to the belief that "non-tonic" muscles may be changed into "tonic" ones according to the season or the animal's metabolic state. For a definitive identification of slow muscle fibers the innervation must also be established. Since the innervation pattern is fixed, as seen in experiments with intracellular electrodes on frogs at all seasons, the slow muscle fiber identity must also be fixed.

Many observations classed as "contracture", or residual shortening, and sometimes unselectively called Tiegels contractures, may have been

due to slow muscle fiber stimulation. The well-known contracture of Bremer, however, obtained most favourably by direct or indirect double stimulation has recently been shown (Bremer and Desmedt) to be accompanied by propagating muscle impulses in twitch fibers. As stated above, the differences between contractures (non-propagated reversible contractions) in twitch fibers and slow fibers are great, but merely quantitative (Fig. 7). Other differences, like the absence of propagating impulses and different membrane properties may well be called qualitative since they set the fiber types completely apart. It is clear now that the well-known assay for ACh on the rectus muscle works only on slow muscle fibers.

The extensive histological studies of Krüger and his collaborators over the past years, summarized in a recent book, have to be noted. On muscle crossections they find fibers with "Felderstruktur" in locations which contain slow muscle elements, e. g. in the slow portion "Tonusbündel" of the iliofibularis, while they identify muscle fibers with "Fibrillenstruktur" in the twitch portion or in muscles like the sartorius. On this basis a correlation of "Felderstruktur" fibers with slow muscle fibers is indicated. In our own studies on the ordinary mammalian skeletal muscle system, however, we have not been able to identify muscle fibers which correspond to the frog's slow elements. They all were found to conduct muscle impulses and give twitches. This physiological test by itself does not exclude differences within the mammalian skeletal system (see below). The *functional* differentiation, however, of mammalian structures in which Krüger finds "Felderstruktur" does not seem clear to us.

The present picture of slow muscle fiber activation as contrasted to twitch fiber excitation appears to be as follows. In twitch fibers motor nerve impulses set up junctional potentials which in turn depolarize the surrounding muscle membrane and start selfpropagating muscle impulses. These sweep along the whole muscle fiber length and activate in an unknown manner the underlying contractile system. There seems little scope left for gradation in single twitch fibers under normal conditions. In contrast, no propagated impulses occur in slow fibers, the small-nerve motor fibers set up local potentials at the junctions which in turn cause local contraction. Since slow muscle fibers possess numerous junctions along their whole course, a nearly simultaneous activation of many parts of such a muscle fiber can take place. Very fine grading of the contractile action in individual slow fibers is brought about (I) by varying the number of active nerve fibers reaching a muscle fiber, and thereby creating more or fewer distinct spots of contraction and (II) by changing the frequency of small-nerve impulses, leading to different intensities of junctional depolarization and thereby to graded contractile

action. The mechanisms underlying the facilitation processes are apparently multiple and presumably occur in nerve terminals, within the junctions themselves, and in the contractile system. Gradation based on local contractions in fibers is well known in many crustaceans muscles (see reviews by KATZ 2, WIERSMA).

In both twitch and slow fibers the membrane change is the precursor of contractile change, but there seems to be a striking difference between the fiber types in the speed of "accomodation" to depolarization. In one case a persistent loss of membrane charge leads to a prolonged, in the other to a transient contraction, i. e. the coupling process between surface and contractile elements is broken slowly or more quickly (Fig. 7). Apparently the method of depolarization—electrical, chemical, mechanical—is not the important factor. Thus there is no evidence which indicates that current flow as such, accompanying the muscle impulse or applied through electrodes, excites the contractile elements directly, nor does KCl or ACh do so. Contractions can be set up by simultaneous depolarization of the whole muscle fiber, for instance by "massive" direct transverse stimulation (SANDOW), without longitudinal current flow or propagating muscle impulses, or by immersion in drugs. In the latter case no significant current flow develops at all if the whole length of a fiber is affected simultaneously. Drug contractures can, however, be abolished or partially reversed if the surface polarization is restored by a current even in the continued presence of the depolarizing agent (KUFFLER 1; FLECKENSTEIN, HILLE and ADAM). In the case of ACh, curare can prevent contracture development or reverse the ACh effect, presumably by its action on the surface and not on the contractile elements. Therefore it seems to be the reduction of membrane potential which is responsible for the initiation of the contractile event. The linkage between surface and fiber interior is not known (see KATZ 3).

Function of small-nerve system: By their constitution the slow muscle fibers appear to be suited to relatively slow contractions only. They can maintain tensions, without neuromuscular fatigue or block, much longer than twitch fibers. Their contractile state is regulated in very fine steps and, in contrast to twitch fibers, is more sensitive to changes of the ionic composition of the environment. Apart from these peripheral properties there exists a specialized central nervous organization controlling the slow muscle fibers through the small-nerve fibers. This is shown by the different reflex excitability of the small-nerve system and especially by the tendency for a continued discharge "at rest", in the absence of obvious movement. Stepped up small-nerve activity, frequently precedes and then accompanies twitch action (Fig. 8), a sign that the two systems also work in unison. This observation agrees with KOBAYASHI, OSHIMA, TASAKI, who recorded discharges in nerve.

The foregoing considerations alone suggest that the small-nerve system may serve as a supplementary organization to the twitch system. It was suggested already many years ago that the "tonic" frog muscles of Sommerkamp and Wachholder are largely concerned with the clasp reflex. Such an exclusive functional specialization is not likely since slow muscle fibers are widely distributed in the body, are not confined to particular functional units like flexors or extensors and are found in males and females at all seasons. Further, they are also present in eye muscles (for details see Kuffler and Vaughan Williams 2). It seems reasonable, therefore, to assign to the small-nerve system a role in general postural activity. In the sense that we are dealing here with an organization which tends to be active for long periods, does not effectively participate in phasic movement, and is relatively resistant to fatigue, one may well call the small-nerve system "tonic". In this context the slow muscle fibers appear more economical for gradual tension development, since their energy can be expended in fine steps according to need, while in the twitch fiber energy is liberated in a sudden maximal burst (Hill).

The actual tension produced by slow muscle fibers in different muscles varies, since their density fluctuates greatly in different regions of the body. The ratios of slow and twitch fibers are not known, but slow fibers seem to be greatly outnumbered wherever tests with intracellular electrodes have been made. More histological counts using Krüger's method, correlated with physiological tests, would be of interest. In some muscles slow fibers can produce 10—15% of the maximal single twitch tension. However, the optimal working condition for slow fibers are low initial tensions, while twitch fibers operate most effectively under higher tensions. Furthermore, isotonic recording conditions, as used in most of the studies by earlier workers, will tend to exaggerate the slow muscle fiber contribution.

Comparative aspects: A system similar to that of frog has not been found in mammals (cat) in spite of prolonged search. The cat's lumbosacral ventral root outflow contains a well defined grouping into large and small-nerve fibers with diameter peaks around 4—6 μ and 12—15 μ (Eccles and Sherrington). Leksell found that the small diameter fibers produced little or no muscle tension, but enhanced the afferent discharge from muscle spindles. In later investigations of the role of these fibers it was possible to isolate large numbers to one muscle and test for contractile effects. It was concluded that the whole group comprising about $^1/_3$ of the ventral root fibers to hind limbs has no effect on the ordinary contractile system but innervates exclusively the intrafusal muscle fibers within spindles (Kuffler, Hunt and Quilliam). By causing minute contractile effects in the muscular elements of the spindles, they

excite the sensory elements by stretch and cause afferent discharges. KOBAYASHI, OSHIMA and TASAKI, in agreement with HUNT and KUFFLER'S general results, report that small-nerve excitation in their studies has not caused detectable tension, but speculating from indirect evidence they link small-nerve activity with decerebrate rigidity. A similar view has been held by HÄGGQUIST for some time. HÄGGQUIST'S findings on animals rendered spastic as a result of cord hypoxia have been repeated and essentially confirmed in our laboratory (unpublished). In each case, however, it is thought that undegenerated large nerve fibers remained in sufficient numbers to account for the spastic state. The intrafusal muscle elements in mammalian spindles seem to us to possess many similarities with slow muscle fibers of frog. Besides being densely innervated by a small diameter nerve spectrum, their activation involves facilitation, they probably give graded contractions, and they also exhibit a similar pharmacological behaviour under the influence of ACh. This drug apparently does not excite the sensory nerve terminals but only the intrafusal muscle fibers and the ACh effect is blocked by curarine without appreciably changing the threshold of the afferent discharge to stretch (HUNT 2).

It has now been well established, especially by the later studies of HUNT, that the mammalian small-nerve system plays a role in reflex activity by regulating the afferent flow of discharges from muscle spindles (see HUNT'S review 1). Although small-nerve fibers cause no direct muscle tension in the ordinary striated muscle fibers, they exert an *indirect* effect on posture. In contrast, the frog's small-nerve system produces principally a direct postural effect besides innervating spindles (KATZ 1). While the frog's mechanism of regulating postural activity seems relatively simple, slow and economical, the cat's organization seems more complex but the additional complexities allow much greater precision (MERTON; GRANIT & STRÖM).

Summary.

1. The results of recent investigations on two distinct nerve-muscle systems in the frog are presented. Each system consists of a special group of nerve fibers which innervate a separate set of striated muscle fibers. (I) The "Twitch System" or "Large-Nerve System" is composed of large diameter ventral root fibers which conduct at 8 to 40 m/sec. and innervate muscle fibers which give the well known propagating muscle impulses and twitch contractions. (II) The "Slow Muscle System" or "Small-Nerve System", consisting of small diameter fibers of 2 to 8 m/sec. conduction velocity which innervate the "slow" muscle fibers. Various properties of the two systems were studied, largely with the use of intracellular electrodes.

2. The small-nerve fibers cause slow contractile changes, resembling smooth muscle activity. Repetitive stimulation is needed for a significant effect. The rate of rise of tension and the amount finally developed, depend on the frequency of nerve stimulation.

3. Each slow muscle fiber is densely innervated by numerous small-nerve fibers over its entire length. Twitch fibers of several muscles have also been shown to receive more than one large-nerve termination, but these are relatively widely spaced. No innervation overlap occurs between the two systems. The motor unit response and its role in grading contraction is discussed in relationship to multiple innervation of slow and of twitch muscle fibers.

4. Slow muscle fibers have membrane potentials of about 60 mV as compared with over 90 mV in twitch fibers. Slow fibers do not give propagating muscle impulses on nerve stimulation but are activated around their numerous junctional regions where local electrical and contractile changes occur.

5. The small-nerve junctional potential (s. j. p.) differs greatly from the larger and faster endplate potential (e. p. p.) which is found at twitch muscle fiber junctions. S. j. p.'s, as recorded with intracellular electrodes inserted anywhere in slow muscle fibers, are composite potentials, set up by the activity of several small axons at their nerve endings. S. j. p.'s rise in 2—3 msec. to a peak of 8—15 mV which is followed by a slow membrane restitution process leading into a phase of hyperpolarization with a gradual return to the resting level. The entire s. j. p. complex may last about 300 to 400 msec. as compared with approximately 30 msec. for the e. p. p.

6. It is concluded that the slow muscle fibers are identical with some of the muscular elements contained in Sommerkamp's "Tonusbündel". The slow fibers also seem responsible for most of the "tonic" phenomena which were extensively studied by Wachholder and other workers. Slow muscle fibers show a specific "electrical" and "chemical" excitability. If depolarized by currents or by drugs they maintain a tension or shortening for prolonged periods, while twitch fibers relax quickly. Assays for Acetylcholine are always done on slow muscle fibers. The relationship between surface charge and contraction is discussed.

7. The small-nerve and large-nerve systems can be activated separately or together by reflex excitation and appear to act synergistically in the maintenance of posture.

8. The differences between the frog's and cat's small-nerve systems are discussed. The small-nerve fibers in mammals innervate muscle spindles exclusively and do not cause muscle tension directly. They exert, however, an important indirect effect on the spinal reflex mechanisms.

References.

Brecht, K.: Muskeltonus. Fortschritte der Zoologie, N. F. Bericht über die Jahre 1945—1950, **9**, 500 (1952). — Brecht, K., and O. Epple: Pflügers Arch. **255**, 315 (1952). — Brecht, K., and H. Feneis: Z. Biol. **103**, 355 (1950). — Bremer, F., and J. E. Desmedt: Arch. internat. Physiol. **55**, 4 (1947). — Eccles, J. C., and C. S. Sherrington: Proc. roy. Soc. Lond. **106** B, 326 (1930). — Fatt, P., and B. Katz: J. of Physiol. **115**, 320 (1951). — Fleckenstein, A., H. Hille and W. E. Adam: Pflügers Arch. **253**, 264 (1951). — Granit, R., and G. Ström: J. Neurophysiol. **14**, 113 (1951). — Günther, P. G.: Anat. Anz. **97**, 175 (1949). — Häggquist, G.: Acta med. scand. **104**, 8 (1940). — Hill, A. V.: Proc. roy. Soc. Lond. B **136**, 399 (1949). — Hunt, C. C.: (1) Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **17**, 113 (1952). — (2) Fed. Proc. **11**, 75 (1952). — Hunt, C. C., and S. W. Kuffler: (in press). — Katz, B.: (1) J. Exper. Bio. (London) **26**, 201 (1949). — (2) Biol. Rev. **24**, 1 (1949). — (3) Research **3**, 359 (1950). — Katz, B., and S. W. Kuffler: J. Neurophys. **4**, 209 (1941). — Kobayashi, Y., K. Oshima, and I. Tasaki: J. Physiol. **117**, 152 (1952). — Krüger, P.: Tetanus und Tonus der Quergestreiften Skelettmuskeln der Wirbeltiere und des Menschen. Leipzig: Akad. Verlag 1952. — Kuffler, S. W.: (1) J. Neurophysiol. **9**, 367 (1946). — (2) Fed. Proc. **11**, 87 (1952). — Kuffler, S. W., and R. W. Gerard: J. Neurophysiol. **10**, 383 (1947). — Kuffler, S. W., and C. C. Hunt: Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis., N. Y. **30**, 24 (1952). — Kuffler, S. W., C. C. Hunt, and J. P. Quilliam: J. Neurophysiol. **14**, 29 (1951). — Kuffler, S. W., Y. Laporte, and R. E. Ransmeier: J. Neurophysiol. **10**, 395 (1947). — Kuffler, S. W., and E. M. Vaughan Williams: (1) J. of Physiol. **121**, 289 (1953). — (2) J. of Physiol. **121**, 318 (1953). — Leksell, L.: Acta physiol. scand. **10**, Sup. 31, 84 pp. (1945). — Libet, B., and E. W. Wright: Fed. Proc. **11**, 94 (1952). — Ling, G., and R. W. Gerard: J. Cellul. Comp. Physiol., Philadelphia **34**, 383 (1949). — Merton, P. A.: J. of Physiol. **114**, 183 (1951). — Nastuk, W. L., and A. L. Hodgkin: J. Cellul. Comp. Physiol., Philadelphia **35**, 39 (1950). — Sandmann, G.: Arch. Anat. Physiol. (Lpz.) **240** (1885). — Sandow, A.: Yale J. Biol. a. Med. **25**, 176 (1952). — Sommerkamp, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **128**, 99 (1928). — Tasaki, I., and K. Mizutani: Jap. J. Med. Sci. **10**, 237 (1944). — Wachholder, K., and J. von Ledebur: Pflügers Arch. **225**, 627 (1930). — Wachholder, K., and F. Nothmann: Pflügers Arch. **120**, 132 (1932). — Wiersma, C. A. G.: Ann. Rev. Physiol. **14**, 159 (1952).

Dr. Stephen W. Kuffler, Wilmer Institute, John Hopkins Hospital and University Baltimore/Maryland USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 136—142 (1953).

Department of Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York and Marine Biological Laboratory Woods Hole, Mass.

Anomalous action of high concentration of microinjected acetylcholine on the spike of the giant axon of squid*.

By

HARRY GRUNDFEST.

With 4 figures.

(Eingegangen am 7. April 1953.)

OTTO LOEWIS capital discovery has been extended by himself and by others far beyond the original scope of his vagusstoffe. Acetylcholine in extremely small concentrations is an excitatory substance for various cells. A jet of approximately 1×10^{-7} μg of acetylcholine directed at the muscle end-plate during 1 msec is sufficient to initiate activity in the muscle fiber, but much higher concentrations directed elsewhere on the fiber surface are ineffective[6]. Similarly, large amounts of acetylcholine, externally applied to nerve fibers have no effect whatsoever[4].

Nevertheless, it has been amply demonstrated[5] that the acetylcholine synthesizing, releasing and hydrolyzing system of nerve and muscle must remain intact for the functional integrity of these excitable tissue. Numerous experiments have shown that acetylcholine, curare, prostigmine, TEPP, and other substances of quaternary ammonium structure do not affect nerve or muscle, because they do not penetrate the barrier of the surface of these tissues[5, 7].

Microinjection of minute quantities of these substances into the giant axon of the squid does cause block of propagation[2]. Curare is by far the most potent, block occuring when 10^{-6} μg of tubocurarine chloride are injected into the axon.

The microinjection experiments have been extended to encompass simultaneous recording of the resting and action potentials at the interior of the giant axon in the region of the injection. The effects of injecting various ions and a series of strategic drugs have important bearing on the present day theories of the bioelectric potential, and are being reported elsewhere[1]. Some findings of anomalous effects when small or large concentrations of acetylcholine are injected into the giant axon are the subject of the present report.

* To OTTO LOEWI, a friend and wise counsellor, with affectionate greetings on the occassion of his 80th birthday.

The experiments were performed on the giant axon of the hindmost stellar nerve of the Woods Hole squid, *Loligo pealii*. A micropipette-electrode containing acetylcholine was inserted into the axon in a region straddled by a pair of external Ag—AgCl wire electrodes. The latter electrode pair recorded on one cathode ray oscillograph beam the diphasic spike initiated by a stimulus applied to an end region of the nerve. Approximately midway in time between the first and second phases of the diphasic spike, the impulse arrived at the internal electrode, and was recorded on the directly coupled second beam of the dual-beam cathode ray oscillograph. Changes in the internal spike or in the resting potential produced by the injection were therefore detectable. Propagation block was signalized by the disappearance of the distal component of the diphasic externally recorded spike (Fig. 1).

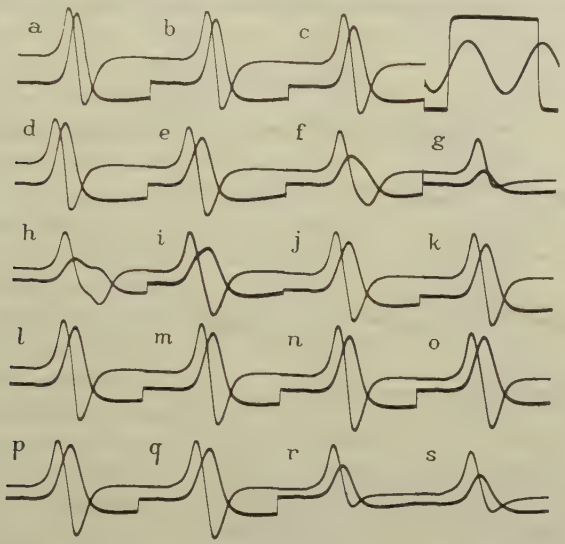


Fig. 1. Effect of injecting acetylcholine in low concentration into the squid giant axon (Expt. 57 25° C, 440 μ fiber, 10 μg/ml Ach. + 10 μg/ml eserine in 0.2 M KCl.).
The resting and action potentials at beginning of the first injection are seen record *a*. The upper trace is of the diphasic, externally recorded spike. The lower trace is the response recorded by the tip of the micropipette electrode situated within the axon in the region approximatey midway between the external recording electrodes. The difference between the base lines of the two traces records the resting potential at the internal electrode. The potentials at the end of the 1st injection (8×10^{-4} μg Ach.) are shown in *b* and 20″ later in *c*. A second injection added 5×10^{-4} μg Ach. The effect on the potentials is shown in *d* to *k* in the following time course: *d*, beginning; *e*, ½″ after injection; *f*, 9″ later, as block was developing; *g*, block complete 11″ after end of injection; *h*, beginning of recovery at 13″; progressing (*i* to *k*) at 15″, and 45″. A third injection (4×10^{-4} μg Ach.) did not cause block as shown in records *l* (before) and *m* (after injection). Two more injections (each 2×10^{-4} μg) did not cause block; records *n* and *o* being respectively the responses 20″ after the end of each injection. A sixth injection added 5×10^{-4} μg Ach. Records *p* to *s* show respectively the responses at the beginning, during and 1″ and 1′ after the injection. Calibrating square pulse 100 mv, time in msec.

The experiment of Fig. 1 illustrates the effects obtained on injecting a dilute solution of acetylcholine into the axon. In this experiment the Ach. concentration was 10 μg/ml accompanied by a similar concentration of eserine. 0.2 M KCl was used as the electrolyte of the liquid junction. Other experiments were done without the eserine or the KCl, with similar results.

The first injection (0.08 mm^3; 8×10^{-4} μg Ach.) had little effect on resting potential or spike (records *a* to *c*). Two minutes later, another injection followed (0.05 mm^3; 5×10^{-4} μg Ach., record *d* to *k*). Eleven seconds after this injection had ended, the internally recorded spike had decreased to 16 mv (record *g*) from a value of 60 mv and propagation block had set in. Recovery, however, began in 2 seconds (record *h*). About 30 seconds later it was nearly complete (record *k*). At 6′ a third injection (0.04 mm^3; 4×10^{-4} μg Ach.) had no effect (records *l* and *m*), nor did two subsequent smaller injections at approximately 2 minute intervals (each 0.02 mm^3; 2×10^{-4} μg Ach., at 8′30″ and 10′50″ respectively: records *n* and *o*). A sixth injection was begun (record *p*) at 12′15″, when 0.07 mm^3 (7×10^{-4} μg) added to the Ach. remnant from the previous injections caused rapid propagation block (records *q* to *s*).

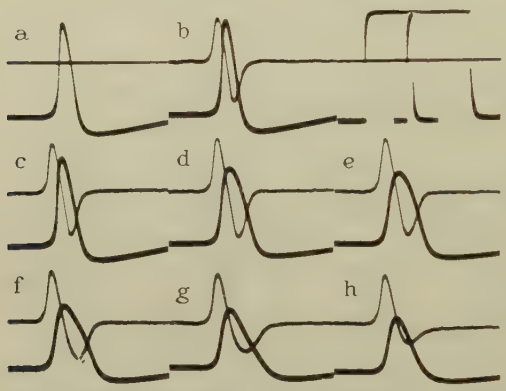


Fig. 2. Effects of injecting 100 mg/ml acetylcholine in 0.2 M KCl. (Expt. 206; 23° C; 440 μ fiber.)
Response at beginning of injection *a*, b—d, at 10″, 30″ and end (60″) of injection of 0.44 mm^3 or 44 μg acetylcholine. Succeeding records, *e*—*h*, 30″, 60″, 90″ and 120″ after end of injection. Records *f* and *g* show the onset of a delayed response beyond the distal external electrode. The persistence of considerable diphasicity in *h* and the large internally recorded spike indicate that the region between the micropipette-electrode and the distal lead remained active. Calibration 2 msec and 0.1 msec, 100 mv square pulses, recorded by the micropipette-electrode.

Because of a number of technical factors, the absolute resting potential was not reliably recorded in this experiment. An initial measurement showed that the resting potential was 36 mv and the spike 72 mv. However, the relative measurements of the changes in the resting potential during the course of each injection are valid. It is therefore seen from Fig. 1 *g* that when block had developed, the internally recorded spike had decreased to 16 mv, while the resting potential had decreased by only 8 mv. At the end of this series, when the spike had recovered height and propagation was again instituted, the resting potential had returned approximately to its initial value (records *d* and *k*). Likewise, after the final injection when the spike had decreased by 18 mv at the moment of propagation block, the resting potential had changed by only 4 mv.

The results of a series of such experiments confirm our earlier findlings[2] and show that when acetylcholine is injected in concentrations of 10 to 100 μg/ml, the blocking dose is approximately 10^{-3} μg. Thus, in the experiment cited, the first 2 injections totalled 1.3×10^{-3} μg and

caused block, but during the 2 minute interval between the first and second injections some diffusion or destruction of acetylcholine must have occurred. The next four injections, which totalled 1.5×10^{-3} μg were also separated by approximately 2 minute intervals.

Quantitatively and qualitatively different results are obtained when the acetylcholine is injected in high concentrations. The most striking results are in 7 experiments with the highest concentration we used — 100 mg/ml or 10,000 times as high as in the experiments described in connection with Fig. 1. In some cases 0.2 M KCl was an added electrolyte, in others the KCl was omitted. Eserine was not used in this series.

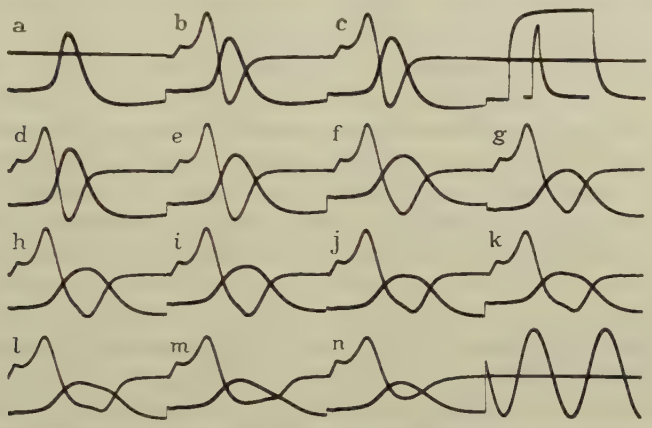


Fig. 3. Effects of injecting 100 mg/ml acetylcholine without KCl. (Expt. 202; 25° C; 410 μ fiber.) The beginning of first injection at *a*, *b* and *c*, at 5″ and at end (10″) of first injection (0.8 mm³, 8 μg Ach.). The spike and resting potential are unchanged, but the former is somewhat prolonged. At *d*, beginning of a second injection (0.5 mm³, 50 μg Ach.), 1′ later. Delay of the spike at the distal electrode is seen in *e* (at 20″), and the spike decreased about 5″ after the end of the 30″ injection (*f*). The delay was progressive through *m*, as was the developing block, but there is considerable diphasicity in *n* and the prolonged internal spike was still large. Records *g*—*n* were taken 10″, 30″, 50″, 1′30″, 2′15″, 2′50″, 3′30″, 3′45″ after last injection. Total elapsed time in this experiment was nearly 6′. As seen from the time relation of the internal and external spike (*b*) the micropipette-electrode was near the distal external lead. Calibrations: 100 mv square pulse, and 1000 cps.

Fig. 2 shows the progress of one such experiment, in which the acetylcholine was accompanied by 0.2M KCl. The resting potential at the beginning was 48 mv and the spike 82 mv. 0.44 mm³ containing 44 μg of Ach. were injected during one minute. Toward the end of the injection period (record *d*) the internal spike decreased about 15 mv, but the resting potential remained unchanged. However, the most striking effect was on the spike duration, which increased about 70% by slowing of the rate of ascent to the peak, delay of the latter, and prolongation of the falling phase. The second phase of the external spike also reached its peak later and was prolonged, indicating a decrease of the conduction velocity. One minute later (record *f*) there was still a propagated response but block occurred beyond the distal lead after another minute had

elapsed (record *h*). At the end of this time the internal spike was still more than 45 mv high and the resting potential had fallen by only 6 mv to 42 mv.

Fig. 3 illustrates another experiment carried out with a solution containing 100 mg/ml acetylcholine but no KCl. The resistance of the pipette-electrode was high and as shown by the calibration curve, the recorded spike for this reason was too small by about 20%. The resting potential at the start of the injection was 40 mv and the corrected spike about 72 mv. An initial injection of 0.08 mm^3 (8 μg Ach.) had no effect on either potential, but prolonged the spike. A second, massive injection 1 minute later introduced 0.5 mm^3 (50 μg Ach.). About 5″ after the injection had ended (*e*) the spike height began to decrease but the broadening of the spike, which was occurring during the injection, continued (*f* to *m*). The second phase of the external spike also broadened and a notch developed (*g*). This indicated incipient block beyond the distal lead. At the end of 2′ there was still a large response on the internal electrode and considerable diphasicity at the distal external lead (*n*).

The most extreme effects of massive injection of acetylcholine that we have observed are shown in Fig. 4. At the end of a small injection (3.8 μg, record *b*) neither the resting potential nor the spike height were altered, although 1′ later (record *c*) before a second, larger injection, the resting potential had decline by 5 mv. The spike duration had increased slightly. 30″ after beginning the second injection (record *d*) the spike duration had increased by almost 50%. At the end of the 45″ injection (record *e*) 54 μg Ach. had been added. The spike duration continued to increase (*f* 10″ after end of injection and *g* 1′20″ later). Although a total of 3′30″ had elapsed getween record *a* and *g* the resting potential had declined by only 7.5 mv, the spike height had *increased* slightly and the spike duration was doubled. The separation between the peaks of the diphasic spike had also doubled, indicating that the conduction velocity had decreased to about half.

At 4′ from the beginning of the series a third injection was started (record *h*) and at its end 30″ later (record *i*) 115 μg Ach. more had been added. The spike continued to prolong and its height again decreased slightly as seen in record *j* (15″) and record *k* (30″ after *i*). There was no significant change in the resting potential.

At 7′ a fourth injection lasting 60″ commenced (record *l*), introducing 156 μg Ach. Records taken at 30″, 45″ and 60″ of the injection (record *m* to *o*) show that the injection had begun to affect markedly the spike at the proximal external lead, with a notch developing at the internal lead (record *o*). The resting potential which had now declined by 30% (comparing records *a* and *l*) was not altered during this injection, but declined within 10″ (record *p*) after the end of the injection. The internal

spike continued to develop the notch (record *q*, 1′30″ later), but even after another 4′ there was still a propagated response (record *r*, taken at a slower sweep speed, without the external diphasic spike). The entire experiment covered a period of nearly 15′ and involved injection of about 3.3 mm^3 of fluid containing almost 330 μg Ach.

At no time in our experiments have we observed excitation of the axon by the injection of acetylcholine. In this respect at least, therefore, the interior of the axonal membrane differs from the external surface of the muscle end plate.

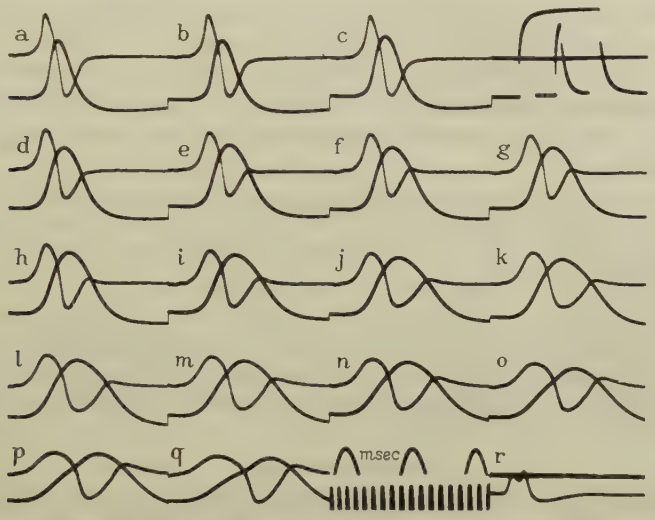


Fig. 4. Extreme effects of a massive injection of acetylcholine. (Expt. 203, 25° C, 475 μ fiber.) The amount of Ach. (100 mg/ml in distilled water) injected was almost 330 μg in four successive injections of 3.8 μg (*a* to *c*); 54 μg (*d* to *g*); 115 μg (*h* to *k*; and 156 μg (*l* to *r*). The square pulse calibration shows that the high resistance electrode system attenuated a 0.1 msec pulse by about 20%, the internal spike as recorded therefore being too small. Time calibrations in msec: lower for record *r*, upper for all others. Further description in text.

Summary.

Injection of dilute solutions of acetylcholine into the giant axon causes block of propagation when the amount of acetylcholine injected is approximately 10^{-3} μg. This action is exerted while the internal spike decreases markedly in amplitude, but does not significantly change in duration. The resting potential is essentially unaffected. On the other hand, injection of a very concentrated solution of acetylcholine causes propagation block only when large amounts (50 to 250 μg) of acetylcholine are injected. The quantitative aspect of the difference is very high—being approximately in the ratio 1 : 100,000. Qualitative differences also occur. The first effect of the large amounts of acetylcholine is to slow the rate of rise of the spike which reaches the same or slightly higher

peak amplitude and then falls more slowly. Associated with the slower rise is a slowing of conduction. The resting potential is not greatly affected. Our experiments in this field are far from completed, but thus far we have found no other substance producing these effects to so extreme a degree. Tha changes in the form of the spike would appear to indicate that acetylcholine injected in high concentration interferes with the specific, sequential ionic phenomena of activity[3].

Otto Loewis discovery of the vagusstoffe has led to almost countless experiments, but these have not yet answered the question raised by his fundamental work, nor do the experiments described here throw immediate further light on the problems posed for us by Otto Loewi. But the impetus provided by his important discovery undoubtedly will give us answers eventually. We can only hope that these answers will have the clarity and simplicity of Otto Loewis own great experimental contributions.

The work reported here is based on a continuing series of studies carried on jointly with Drs. M. Altamirano, C. Y. Kao, and D. Nachmansohn. They are supported in part by a grant to the present author from the Atomic Energy Commission (AT-(30—1) 1076).

A large series of experiments in the summer of 1953 confirmed the results described and demonstrated that some analogues of acetylcholine have the same action, which appears to be linked to interference with sodium transport. On the other hand, the high blocking potency of curare observed in earlier work was not confirmed with improved techniques.

References.

[1] Grundfest, H., M. Altamirano and C. Y. Kao: J. Gen. Physiol. To be published. — [2] Grundfest, H., C. Y. Kao, D. Nachmansohn and R. Chambers: Nature **169**, 190 (1952). — [3] Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley: J. of Physiol. **117**, 800 (1952). — [4] Lorente de Nó, R.: Effects of choline and acetylcholine chloride upon peripheral nerve fibers. J. Cell. Comp. Physiol. **24**, 85 (1944). — [5] Nachmansohn, D.: Chemical mechanisms of nerve activity. In Barron (ed.) Modern Trends in Physiology and Biochemistry. New York, Academic Press, 1952. — [6] Nastuk, W. L.: Fed. Proc. **12**, 102 (1953). — [7] Rothenberg, M.A., D. B. Sprinson and D. Nachmansohn: J. Neurophysiol. **11**, 111 (1948).

Dr. Harry Grundfest, Dep. of Neurology College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 143—156 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Eichholtz)
und dem Department of Pharmacology University of Oxford
(Vorstand: Prof. Dr. H. J. Burn).

Zum Mechanismus der Wirkungsverstärkung und Wirkungsabschwächung sympathomimetischer Amine durch Cocain und andere Pharmaka.

I. Mitteilung.

Die Sensibilisierung der Katzen-Nickhaut für Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe*.

Von
A. Fleckenstein und H. Bass**.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. August 1953.)

A. Fröhlich und O. Loewi berichteten 1910 als erste über die Verstärkung der pressorischen und mydriatischen Wirkung von Adrenalin durch Cocain. In zahlreichen Untersuchungen ist diese Entdeckung seitdem bestätigt und erweitert worden. Trotzdem hat dieses Phänomen bis heute keine befriedigende Erklärung gefunden.

Nach einer viel diskutierten Hypothese soll Cocain durch Hemmung der Aminoxydase den Abbau von Adrenalin und verwandten Substanzen verzögern und dadurch deren Effekt erhöhen (F. Philpot) Diese Deutung stößt jedoch auf gewisse Schwierigkeiten:

a) Nur die Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe werden durch Cocain erheblich verstärkt, während z. B. Tyramin nach Cocainisierung seinen Effekt verliert („The cocaine paradox" nach Burn und Tainter). Gerade Tyramin ist ein gut bekanntes Substrat der Aminoxydase; man müßte daher unter dem Einfluß von Cocain eine Verstärkung der Tyraminwirkung, aber keine Abschwächung erwarten.

b) Umgekehrt können Corbasil und Dioxyephedrin von der Aminoxydase nicht angegriffen werden; trotzdem ruft Cocain an der

---

* Eine vorläufige Mitteilung erfolgte am 5. 8. 1952 auf der 16. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Göttingen (Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 218 117 [1953]). Über weitere Teilergebnisse wurde auf dem Kongreß der Deutsch. Ges. f. Inn. Med., Wiesbaden 1953 (vgl. Verh. S. 17) berichtet.

** Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Otto Loewi zum 80. Geburtstag (3. 6. 1953) gewidmet.

Nickhaut der Katze für Corbasil und Dioxyephedrin eine noch stärkere Sensibilisierung als für Adrenalin hervor (Fleckenstein). Nach der Aminoxydase-Theorie müßte Cocain in diesem Falle wirkungslos sein.

Diese Diskrepanzen zwingen, einen anderen Erklärungsversuch im Auge zu behalten: Es ist schon lange bekannt, daß Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe (l-Adrenalin, d-Adrenalin, Epinin, Dioxyephedrin, Noradrenalin) nicht nur an cocainisierten, sondern auch an denervierten Nickhäuten gesteigerte Effekte zeigen (Bacq). Auch an der denervierten und cocainisierten Pupille wirkt Adrenalin verstärkt. Dagegen reagiert die Pupille nach Cocainisierung und Denervierung nicht mehr auf Tyramin (Burn u. Tainter). *Diese Parallelen zwischen Denervierung und Cocainisierung legen die Frage nahe, ob etwa Cocain seine Effekte auf sympathomimetische Amine durch Ausschaltung oder Dämpfung sympathischer Nervenendigungen ausübt, d. h. eine Art „pharmakologische Denervierung" erzeugt.* Von Fröhlich und Loewi (1910), Poulsson (1920), Burn und Tainter (1931) sowie Bacq (1937) ist dieses Problem schon früher angeschnitten worden; das damals vorliegende experimentelle Material war jedoch zu einer Entscheidung nicht ausreichend. Die folgenden Untersuchungen sollten daher auf breiterer Basis — zunächst unter Verwendung sympathomimetischer Stoffe aus der Brenzkatechin-Reihe — klären, ob das Verhalten cocainisierter Nickhäute tatsächlich mit dem Verhalten denervierter Nickhäute qualitativ und quantitativ übereinstimmt.

Experimenteller Teil.

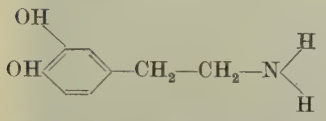
Methode.

Die Denervierung der Nickhaut erfolgte an Katzen von 2—3 kg stets einseitig in aseptischer Operation durch Exstirpation des rechten ganglion cervicale superius. Die Katzen wurden dann meist 3—50 Tage nach der Denervierung in den eigentlichen Versuch genommen. Dabei wurde in Äther-Narkose das Cervikalmark nach der Daleschen Methode (Burn, Finney u. Goodwin) — ohne Abklemmung der Carotiden — durchtrennt und das Gehirn zerstört. Anschließend wurde das Narkoticum abgesetzt und künstliche Beatmung durchgeführt. Nach Befestigung des Kopfes und präganglionärer Durchschneidung des Halssympathicus auf der linken Seite wurden Fäden durch beide Nickhäute gezogen, so daß ihre Kontraktionen durch isotonische Hebel (Stirnschreibung) mit 7,4facher Vergrößerung registriert werden konnten. Der Blutdruck wurde an der einen A.-femoralis gemessen; die Injektionen wurden in die V. femoralis der anderen Seite gegeben. Die Cocain-Dosis betrug im allgemeinen 15 bis 25 mg/Katze bei langsamer i. v. Injektion in etwa 10 min. Von den einzelnen sympathomimetischen Stoffen wurden jeweils 6 Dosen hintereinander i. v. injiziert, wobei die folgende Dosis jeweils doppelt so groß wie die vorausgegangene war. Die letzte Dosis betrug also jeweils das 32fache der Anfangsdosis. Auf diese Weise lassen sich für jedes Sympathomimeticum Diagramme ermitteln, die die Reaktionen der Nickhäute in einem weiten Dosierungsbereich wiedergeben.

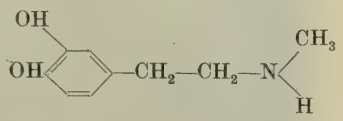
Ergebnisse.

Das Verhalten der denervierten und cocainisierten Nickhäute wurde unter Verwendung von Adrenalin, Noradrenalin und 6 weiteren sympathomimetischen Testsubstanzen geprüft (vgl. Tab. 1). Bei den Stoffpaaren Adrenalin-Noradrenalin, Epinin-Dioxyphenyläthylamin, Dioxyephedrin-Corbasil ist jeweils die eine Substanz N-methyliert, die andere Substanz ist die entsprechende Nor-Verbindung. Neosynephrin (m-Sympatol, Adrianol) besitzt nur 1 OH-Gruppe im Ring in m-Position, gleicht aber trotzdem im Wirkungscharakter den genannten Catecholaminen. Von besonderem Interesse ist die 8. Testsubstanz Dioxyphenylmorpholin (A 40), die an Stelle der üblichen stickstoffhaltigen Seitenkette einen Morpholin-Ring aufweist[1].

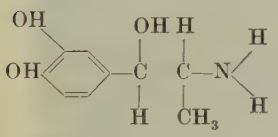
Tabelle 1.



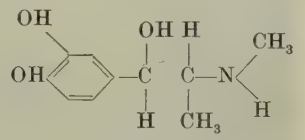
Dioxyphenyläthylamin (Dopamin)



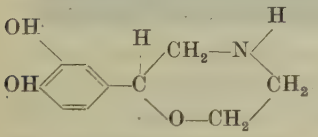
Epinin



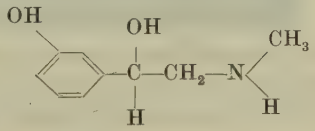
Corbasil



Dioxyephedrin



Dioxyphenylmorpholin (A 40)



Neosynephrin (m-Sympatol, Adrianol)

Über die charakteristischen Wirkungen dieser Sympathomimetica (außer A 40) an der normalen und denervierten Nickhaut der Katze wurde erst kürzlich von Fleckenstein und Burn berichtet. Noradrenalin, Corbasil und Epinin wirken an der normalen Nickhaut — im Vergleich zu ihren Blutdruckeffekten — relativ schwach; dagegen vermag l-Adrenalin und d-Adrenalin die normale Nickhaut erheblich stärker zu stimulieren. Abb. 1 läßt diese typischen Unterschiede gut erkennen. Auch das Ausmaß der Potenzierung an der denervierten Nickhaut zeigt

[1] Für die Überlassung dieser Substanz sind wir Herrn Dr. H. Wick, Pharmakol.-Laboratorium der Firma C. H. Boehringer u. Sohn, Ingelheim, sehr zu Dank verpflichtet.

von Stoff zu Stoff auffällige Besonderheiten: *Schon 48 Std nach Exstirpation des oberen Cervicalganglions tritt für Noradrenalin, Corbasil und Epinin eine gewaltige Sensibilisierung ein, die für einzelne Dosen das 30—60fache der Norm beträgt; dagegen wird die Adrenalinwirkung nur mäßig gesteigert.* Diese typischen Eigenschaften der denervierten Nickhaut sind im allgemeinen nach 3—4 Tagen voll ausgebildet und ändern sich dann kaum mehr während einer Beobachtungszeit von

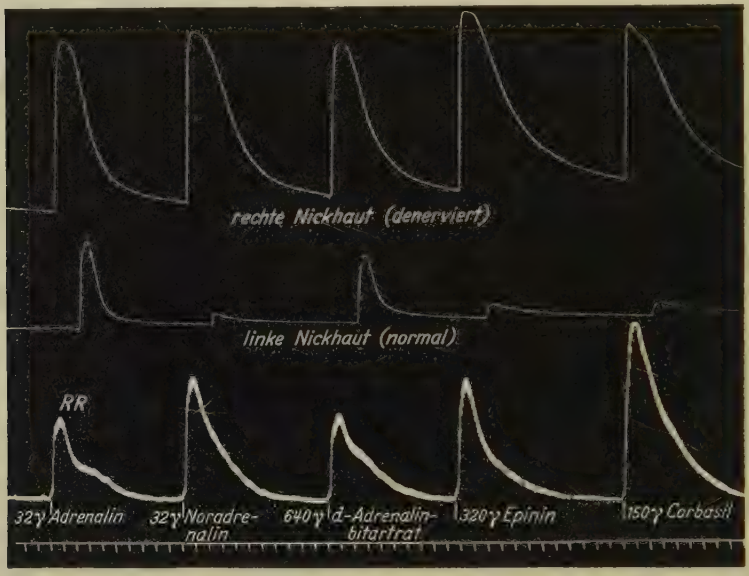


Abb. 1. Vergleich der Wirkungen von Adrenalin, Noradrenalin, Epinin und Corbasil an der normalen und denervierten Nickhaut. Katze ♂, 3 kg, 48 Std nach Exstirpation des Ganglion cervicale superius der rechten Seite. Registrierung der Bewegungen der rechten Nickhaut (denerviert) und der linken Nickhaut (nicht denerviert) sowie des Blutdrucks.

50 Tagen. Dioxyephedrin steht — beurteilt nach dem Grad der Verstärkung — den Stoffen vom Typ des Noradrenalins nahe; Neosynephrin entspricht dagegen mehr dem Adrenalin. Dioxyphenyläthylamin (Dopamin) und Dioxyphenylmorpholin (A 40) nehmen eine Mittelstellung ein. Es ergibt sich somit an der denervierten Nickhaut eine Reihe von Kriterien, die einen genaueren quantitativen Vergleich mit der cocainisierten Nickhaut ermöglichen.

Tatsächlich werden nun alle Sympathomimetica, die nach Denervierung erhöhte Effekte besitzen, auch durch Cocain in ganz ähnlicher Weise verstärkt. Abb. 2 zeigt z. B., daß auch an der cocainisierten Nickhaut Noradrenalin, Corbasil und Epinin die stärkste Potenzierung erfahren, während die Wirkung von Adrenalin nur mäßig gesteigert wird. Während

die Ausbildung der Denervierungseffekte — offenbar in Abhängigkeit von der Degeneration der postganglionären sympathischen Fasern — Tage benötigt, tritt die Cocainwirkung sofort ein: Schon 1 min nach intravenöser Injektion von Cocain gleicht sich eine normale Nickhaut dem Verhalten einer chronisch denervierten Nickhaut an.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für normale, denervierte und cocainisierte Nickhäute bei Injektion steigender Mengen von Adrenalin, Noradrenalin und der übrigen von uns geprüften Sympathomimetica der

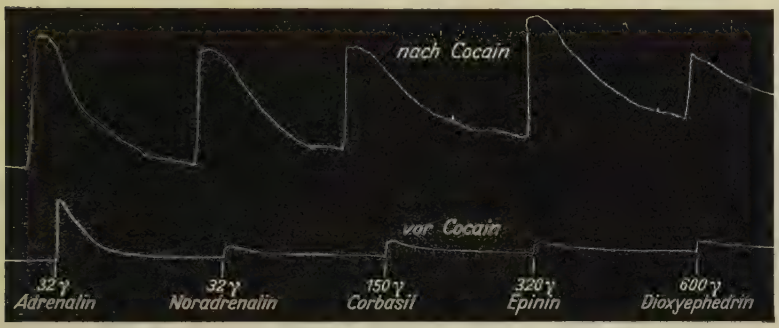


Abb. 2. Vergleich der Wirkungen von Adrenalin, Noradrenalin, Corbasil, Epinin und Dioxyephedrin an der normalen und cocainisierten Nickhaut. Katze ♂, 2,8 kg, Registrierung der Bewegungen der linken Nickhaut vor und nach 5 mg/kg Cocain.

Brenzkatechin-Reihe sind Tab. 2 zu entnehmen (zusammengefaßte Ergebnisse an insgesamt 140 Spinalkatzen).

Die Übereinstimmung von Denervierung und Cocainisierung läßt sich quantitativ noch näher belegen: Aus den Mittelwerten von Tab. 2 kann für jede Dosis eines jeden Sympathomimeticums ein „*Potenzierungsfaktor*" berechnet werden, der das Ausmaß der Verstärkung jeweils exakt wiedergibt:

$$\text{Potenzierungsfaktor für Denervierung} = \frac{\text{Kontraktion denerv. Nickhaut cm}}{\text{Kontraktion normale Nickhaut cm}}$$

$$\text{Potenzierungsfaktor für Cocain} = \frac{\text{Kontraktion cocainisierte Nickhaut cm}}{\text{Kontraktion normale Nickhaut cm}}.$$

Trägt man die auf diesem Wege erhaltenen Potenzierungsfaktoren auf der Ordinate, die dazugehörigen Dosen logarithmisch in mol auf der Abszisse auf, so ergibt sich für den ganzen Dosierungsbereich eines Sympathomimeticums jeweils eine „*Denervierungs-Potenzierungs-Kurve*" und eine „*Cocain-Potenzierungs-Kurve*". Abb. 3 enthält eine Zusammenstellung der Denervierungs-Potenzierungs-Kurven für Adrenalin, Neosynephrin, Dioxyphenylmorpholin, Noradrenalin, Corbasil und Epinin;

Tabelle 2. *Mittlere Kontraktionshöhe (mm) der normalen, denervierten und cocainisierten Nickhäute von 140 Spinalkatzen bei i. v. Injektion verschiedener Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe.* (Hebelvergrößerung 7,4.)

		1 γ	2 γ	4 γ	8 γ	16 γ	32 γ	Zahl der für jeden Mittelwert durchgeführten Versuche
Adrenalin	Normale Nickhaut	0,76 (± 0,16)	2,31 (± 0,4)	5,35 (± 0,66)	12,2 (± 1,1)	20,9 (± 1,6)	31,4 (± 2,2)	32
	Denervierte Nickhaut	14.7 (± 1,9)	21,4 (± 2,2)	30,7 (± 2,9)	42,2 (± 3,6)	55,3 (± 4,7)	55,7 (± 3,6)	25
	Cocainisierte Nickhaut	9,4 (± 1,5)	14,4 (± 1,3)	21,0 (± 1,6)	29,6 (± 1,9)	37,7 (± 1,6)	46,9 (± 2,7)	7
		1 γ	2 γ	4 γ	8 γ	16 γ	32 γ	
Noradrenalin	Normale Nickhaut	0,09 (± 0,04)	0,27 (± 0,17)	0,71 (± 0,26)	2,36 (± 0,4)	5,05 (± 0,5)	9,19 (± 0,8)	40
	Denervierte Nickhaut	11,9 (± 1,2)	18,0 (± 1,6)	28,0 (± 2,0)	38,2 (± 2,4)	48,5 (± 3,1)	50,1 (± 2,7)	37
	Cocainisierte Nickhaut	5,7 (± 0,9)	9,1 (± 1,3)	14,1 (± 1,6)	19,9 (± 1,7)	28,1 (± 2,0)	35,3 (± 2,3)	15
		10 γ	20 γ	40 γ	80 γ	160 γ	320 γ	
Epinin	Normale Nickhaut	0,12 (± 0,08)	0,41 (± 0,18)	1,24 (± 0,5)	2,75 (± 0,8)	5,43 (± 1,37)	10,7 (± 2,0)	12
	Denervierte Nickhaut	9,7 (± 1,6)	16,5 (± 3,1)	25,9 (± 3,7)	34,9 (± 4,3)	41,5 (± 4,4)	46,5 (± 4,3)	6
	Cocainisierte Nickhaut	8,4 (± 1,7)	14,8 (± 2,0)	20,3 (± 2,0)	25,9 (± 1,8)	31,6 (± 1,8)	39,0 (± 2,3)	6
		4 γ	8 γ	16 γ	32 γ	64 γ	128 γ	
Corbasil	Normale Nickhaut	0,1 (± 0,05)	0,41 (± 0,25)	1,23 (± 0,85)	1,85 (± 0,87)	3,18 (± 1,09)	6,23 (± 1,37)	15
	Denervierte Nickhaut	6,3 (± 2,2)	12,0 (± 2,7)	19,2 (± 2,9)	26,4 (± 2,6)	33,9 (± 2,8)	37,0 (± 3,2)	6
	Cocainisierte Nickhaut	4,3 (± 1,1)	7,0 (± 1,7)	10,5 (± 2,0)	13,2 (± 2,3)	17,7 (± 2,4)	25,2 (± 2,5)	9

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

		20 γ	40 γ	80 γ	160 γ	320 γ	640 γ	Zahl der für jeden Mittelwert durchgeführten Versuche
Dioxyephedrin	Normale Nickhaut	0,1 (± 0,04)	0,24 (± 0,02)	0,66 (± 0,1)	1,94 (± 0,5)	4,06 (± 0,9)	10,5 (± 1,6)	16
	Denervierte Nickhaut	3,6 (± 1,9)	6,8 (± 2,5)	11,4 (± 3,2)	20,8 (± 3,4)	27,5 (± 4,2)	41,4 (± 4,9)	8
	Cocainisierte Nickhaut	0,5 (± 0,3)	1,8 (± 0,5)	2,9 (± 0,6)	7,3 (± 0,8)	12,3 (± 1,3)	22,6 (± 2,5)	8
		0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	0,8 mg	1,6 mg		
Dioxyphenyläthylamin (Dopamin)	Normale Nickhaut	0,95 (± 0,7)	2,7 (± 1,7)	4,6 (± 2,1)	10,3 (± 2,2)	24,4 (± 2,9)	—	10
	Denervierte Nickhaut	18,0	25,0	35,2	50,0	64,0	—	4
	Cocainisierte Nickhaut	4,2	8,5	13,6	21,6	32,9	—	5
		5 γ	10 γ	20 γ	40 γ	80 γ	160 γ	
Neosynephrin (m-Sympatol Adrianol)	Normale Nickhaut	1,0 (± 0,36)	3,3 (± 1,04)	7,0 (± 1,6)	13,7 (± 1,9)	21,9 (± 2,2)	32,4 (± 3,2)	10
	Denervierte Nickhaut	8,25	14,0	21,8	29,0	41,0	54,7	4
	Cocainisierte Nickhaut	10,3 (± 1,4)	16,3 (± 1,7)	22,3 (± 2,0)	31,7 (± 2,2)	40,0 (± 2,6)	46,7 (± 3,1)	6
		10 γ	20 γ	40 γ	80 γ	160 γ	320 γ	
Dioxyphenylmorpholin (A 40)	Normale Nickhaut	0,35 (± 0,2)	0,53 (± 0,2)	1,20 (± 0,5)	2,5 (± 1,2)	5,2 (± 1,8)	13,0 (± 3,2)	7
	Denervierte Nickhaut	10,3	12,7	16,8	23,2	32,5	41,6	3
	Cocainisierte Nickhaut	4,2 (± 1,1)	5,9 (± 1,6)	10,3 (± 1,5)	15,1 (± 1,9)	22,6 (± 2,0)	32,9 (± 1,8)	7

in Abb. 4 sind die entsprechenden Cocain-Potenzierungs-Kurven wiedergegeben. *Der Vergleich von Abb. 3 und Abb. 4 zeigt als Endresultat, daß die denervierten und cocainisierten Nickhäute tatsächlich auch im einzelnen identisch reagieren.* Das Ausmaß der Cocain-Potenzierung bleibt zwar hinter dem Ausmaß der Potenzierung durch Denervierung etwas zurück;

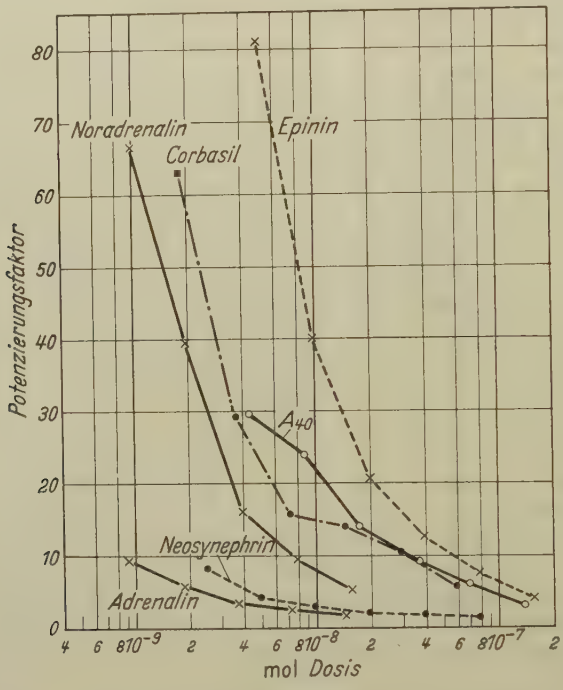


Abb. 3. Denervierungs-Potenzierungs-Kurven für einige Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe.

im allgemeinen wird jedoch über 50% des vollen Denervierungseffektes bei der intravenösen Cocainisierung erreicht.

Besprechung.

a) *Zur Frage der „pharmakologischen Denervierung" durch Cocain.*

Die vorliegenden Befunde lassen wenig Zweifel, daß der Mechanismus der Potenzierung durch Cocain und durch Denervierung aus einem einzigen theoretischen Ansatz heraus erklärt werden muß; dabei liegt es am nächsten, anzunehmen, daß Cocain die Aktivität der sympathischen Nervenendigungen bis zu einem — der operativen Denervierung ähnlichen — Grade reduzieren kann und dadurch alle Folgezustände einer operativen Denervierung akut zu imitieren vermag.

Die Übereinstimmung im Verhalten denervierter und cocainisierter Nickhäute tritt nicht nur bei der Potenzierung der Brenzkatechin-Derivate zutage, sondern zeigt sich ebenso bei solchen sympathomimetischen Stoffen, die an der denervierten Nickhaut stark abgeschwächt oder un-

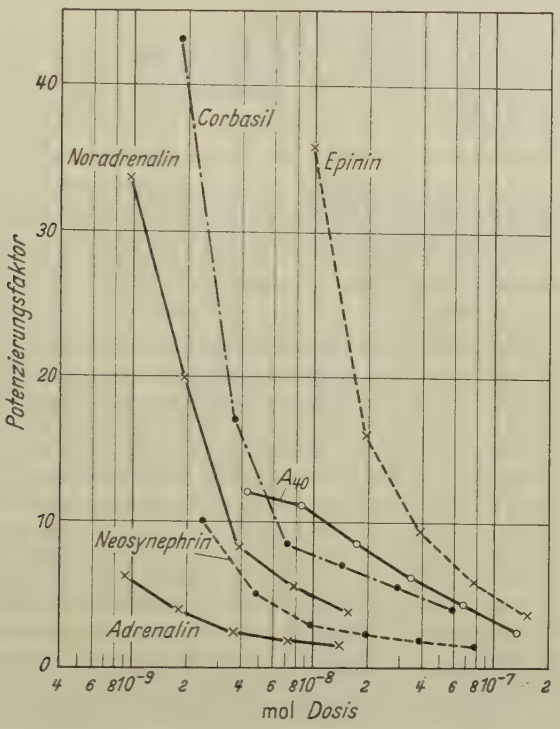


Abb. 4. Cocain-Potenzierungs-Kurven für einige Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe.

wirksam werden: Substanzen dieser Art sind z. B. Tyramin, Phenyltähylamin, Benzedrin, Pervitin, Veritol (Fleckenstein u. Burn) sowie Cyclohexylaminopropan und Phenylmethylmorpholin (Fleckenstein); alle diese Stoffe verlieren auch nach Cocainisierung ihren Nickhaut-Effekt bis auf einen kleinen Rest. Hierüber wird noch näher berichtet.

Bei i. v.-Injektion von Cocain zeigt die normale Nickhaut einer Spinalkatze regelmäßig einen Tonusanstieg. Auch diese Wirkung scheint nichts anderes als ein Angleichen an das Verhalten der denervierten Nickhaut zu sein, die sich beim Spinaltier fast immer im Zustand einer leichten Kontraktur befindet. Entscheidend für diese Tonuserhöhung ist offenbar die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber dem Adrenalin im Blut; diese Sensibilisierung kann manchmal soweit gehen, daß die cocainisierte bzw. denervierte Nickhaut bei unruhigem Blutdruck alle spontanen Schwankungen der Blutdruckkurve mitschreibt. Ähnlich könnte die Cocain-Mydriasis

gedeutet werden: Wenn die Aktivität der sympathischen Nervenfasern durch Cocain gehemmt wird, wird das im Kammerwasser befindliche Noradrenalin bzw. Adrenalin verstärkt zur Wirkung kommen. *Auch die dem Cocain eigenen „sympathischen Reizeffekte" an Nickhaut und M. dilatator pupillae sind also ohne Schwierigkeit auf eine Dämpfung der Sympathicusfasern zurückzuführen.*

Es ist schon lange bekannt, daß Cocain 24—36 Std nach Entfernung des Ganglion cervicale superius beim Kaninchen seine erweiternde Wirkung auf die Pupille einbüßt (Schöler 1885). Beim sogenannten „peripheren Hornerschen Syndrom" des Menschen infolge Degeneration der postganglionären Fasern des Halssympathicus wirkt Cocain ebenfalls nicht mehr mydriatisch. Auch die chronisch denervierte Nickhaut reagiert nach unseren Beobachtungen auf Cocain nicht mit Tonusanstieg. Die Erklärung für diesen Ausfall des Cocain-Effektes nach Denervierung ergibt sich aus der dargelegten Auffassung von selbst: *Eine zusätzliche „pharmakologische Denervierung" kann nicht mehr stattfinden, wenn die Sympathicusfasern bereits vorher degeneriert sind.*

Die Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe können nicht nur durch Cocain, sondern auch durch andere Lokalanästhetika verstärkt werden. An der Nickhaut der Katze ruft z. B. auch Tutocain eine kräftige Sensibilisierung für Noradrenalin und eine schwächere für Adrenalin hervor. Dagegen beobachteten wir nach i. v.-Gaben von Novocain, Pantocain, Panthesin, Psicain „Neu" und Percain an der Nickhaut keine gesteigerten Noradrenalin-Effekte. Novocain und Percain wirkten sogar abschwächend. Dafür vermag Novocain die pressorische Wirkung von Adrenalin zu erhöhen. Umgekehrt scheint z. B. Cocain nur an der Nickhaut, nicht aber am Blutdruck für Dioxyphenylmorpholin (A 40) zu sensibilisieren. Auch lokalanästhetische Antihistaminkörper (Phenergan, Neoantergan, Histaphen) können teils an der Nickhaut, teils am Blutdruck cocain-ähnlich wirken (Lecomte und Fischer). Die Verstärkung von Adrenalin durch Lokalanästhetika (Cocain, Novocain, Pantocain, Tutocain) wird nach den Ergebnissen von Eichholtz und Hoppe an der Steigerung der Toxizität (Lungenödem, Krampf, Erniedrigung der letalen Dosis) besonders deutlich (vgl. auch Taubmann und Jung. Ölkers).

Auffällig sind die sehr geringen Cocain-Dosen, bei denen die Sensibilisierung der Nickhaut beginnt (ca. 0,25 mg/kg). Eine maximale, unter Umständen stundenlang anhaltende Wirkung wird im allgemeinen schon mit 5 mg/kg Cocain erzielt.

Auch für die Ausschaltung der sensiblen Fasern des Bezold-Jarisch-Reflexes im Herzen wird nach den Ergebnissen von Eichholtz, Fleckenstein und Muschaweck sowie Fleckenstein (1949) etwa 5 mg/kg Cocain benötigt. Dieser Effekt klingt jedoch — im Gegensatz zur Adrenalinsensibilisierung — schon nach kurzer Zeit ab und wird im übrigen fast unterschiedslos von jedem Lokalanästhetikum gegeben (Fleckenstein, Muschaweck und Bohlinger). Es ist zu erwarten, daß eine Nickhautsensibilisierung nur bei solchen lokalanästhetischen Stoffen zustande kommt, die nicht von sich aus — infolge eines sympatholytischen Effektes — die Wirkung der Sympathomimetica auf die Nickhaut direkt hemmen. Cocain ist in dieser Beziehung besonders günstig (vgl. Fleckenstein, 1952).

Zweifellos ist kein anderes — bisher geprüftes — Lokalanästheticum zu derart intensiven und dauerhaften Sensibilisierungseffekten befähigt

wie Cocain. Diese Sonderstellung von Cocain ist wohl nur durch eine besonders hohe, d. h. „spezifische" Affinität von Cocain für die Sympathicus-Fasern zu erklären. Im Prinzip sind solche Spezifitäten in der großen Gruppe erregungshemmender Pharmaka mit lokalanästhetischen Effekten nicht ungewöhnlich; denn ebenso wie Cocain die sympathischen Nervenendigungen elektiv zu dämpfen scheint, sind z. B. andere derartige Pharmaka an den glatten Muskeln (Parasympatholytica, Sympatholytica, Antihistaminkörper) oder an den motorischen Endplatten (curarisierende Stoffe) oder an den vegetativen Ganglien (Ganglienblocker) elektiv wirksam.

b) Sinn und Ursache der Potenzierung sympathomimetischer Catecholamine durch Denervierung und Cocainisierung.

Es ist auffällig, daß die Sensibilisierung der denervierten Nickhaut für die Catecholamine etwa zur selben Zeit (3—4 Tage) maximal wird, in welcher der Noradrenalin-Spiegel in einem sympathisch denervierten Organ (Milz, Leber, Niere) nach den Untersuchungen von U. S. v. Euler und Purkold auf ein Minimum absinkt. *Diese Koinzidenz legt die Vermutung nahe, daß die sympathisch innervierte glatte Muskelfaser um so empfindlicher für Noradrenalin und andere Catecholamine wird, je weniger Noradrenalin von den degenerierenden sympathischen Nervenendigungen geliefert werden kann.* Ähnliche Verhältnisse liegen anscheinend auch am quergestreiften Muskel vor; denn auch hier hat der Schwund des chemischen Erregungsüberträgers Acetylcholin aus den degenerierenden Nervenfasern eine stark erhöhte Acetylcholin-Empfindlichkeit zur Folge.

Die normal innervierte Muskelfaser befindet sich offenbar in einer Art „Akkomodation" an den chemischen Erregungsüberträger; diese Akkomodation verschwindet, wenn die Menge der freigesetzten Erregungs-Substanz zurückgeht.

Die theoretische Begründung dieser Phänomene könnte vielleicht auf der Basis der umstrittenen Straubschen Potentialstoff-Theorie versucht werden. Andere Autoren sehen die Ursache der Empfindlichkeitssteigerung in einer verminderten Aktivität der Aminoxydase bzw. Cholinesterase (vgl. hierzu Burn und Robinson).

Wenig diskutiert ist bisher die physiologische Bedeutung, die den Sensibilisierungs-Phänomenen möglicherweise zukommt: Es ist kein Zweifel, daß die enorm gesteigerte Noradrenalin-Empfindlichkeit der Nickhaut nach Degeneration der Sympathicus-Fasern oder nach maximaler Cocainisierung einen Extremfall darstellt; dagegen können bei einem unvollständigen Ausfall der Sympathicus-Fasern (1—48 Std nach Ganglien-Exstirpation; geringe Cocain-Dosen) alle Grade schwacher bis starker Sensibilisierung zur Beobachtung kommen. *Die hochgradige Sensibilisierung nach voller Ausschaltung der Sympathicus-Fasern scheint also nur die extremen Möglichkeiten eines Mechanismus zu demonstrieren, dessen eigentlicher physiologischer Sinn vielleicht in der Anpassung der*

Empfindlichkeit des sympathisch innervierten Endorgans an die jeweils freigesetzten Noradrenalinmengen erblickt werden kann. Hierdurch könnte z. B. nach Abnahme der Noradrenalin-Produktion an den Nervenendigungen die Empfindlichkeit der Muskelfaser für Noradrenalin so gesteigert werden, daß die sympathischen Nervenimpulse trotzdem wirksam bleiben.

In Abb. 5 ist ein Experiment an der Spinalkatze wiedergegeben, das diese Zusammenhänge zu demonstrieren scheint: In Teil A wird eine *normale* Nickhaut abwechselnd durch i. v. Injektion von 32 γ Noradrenalin (Nor) und durch präganglionäre elektrische Reizung des Halssympathicus (E) zur Kontraktion gebracht.

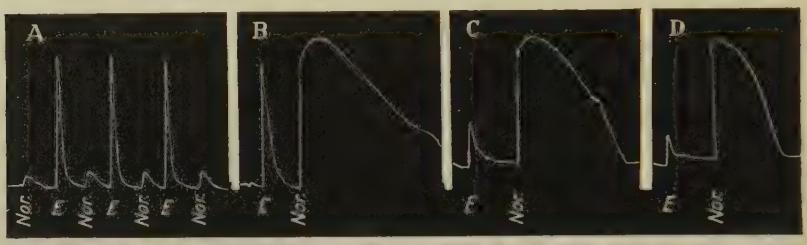


Abb. 5. Kontraktionen der Nickhaut bei wiederholter intravenöser Injektion von 32 γ Noradrenalin (Nor) und bei präganglionärer elektrischer Sympathicus-Reizung (*E*) vor und nach Cocainisierung. Katze ♂, 3 kg, jeweils 10 sec submaximale Reizung mit Kondensator-Entladungen. Teil A vor Cocain, Teil B nach 5 mg/kg Cocain, Teil C und D nach 7,5 mg/kg bzw. 10 mg/kg Cocain. Nähere Erläuterungen im Text.

Die elektrische Reizung ist erheblich wirksamer als 32 γ Noradrenalin. Teil B zeigt das Verhalten derselben Nickhaut nach i. v. Injektion von 5 mg/kg Cocain: *Die gewaltige Verstärkung des Noradrenalin-Effektes spricht dafür, daß die Nickhaut nunmehr „pharmakologisch denerviert" ist; trotzdem ist der Effekt der elektrischen Sympathicus-Reizung noch völlig unverändert.*

Dieses offensichtliche Dilemma, dem auch schon Burn und Tainter am Darm begegnet sind, wird vielleicht aus den vorausgegangenen Erörterungen verständlich: Tatsächlich könnte die Sympathicus-Faser weitgehend gehemmt sein; das wenige — von ihr noch freigesetzte — Noradrenalin würde dann aber in ähnlichem Maße verstärkt wirksam werden, wie das i. v. injizierte Noradrenalin. Die Größe der Nickhaut-Kontraktion bräuchte sich daher zunächst gar nicht zu ändern. Erst bei weiteren Cocain-Gaben (7,5 mg/kg in Teil C; 10 mg/kg in Teil D) würde dann die Noradrenalin-Potenzierung zur Kompensierung der herabgesetzten nervösen Noradrenalin-Freisetzung nicht mehr ausreichen.

Wir sind uns über das Hypothetische der vorliegenden Deutung durchaus im klaren; die Tatsachen legen aber den Gedanken an einen *physiologischen Mechanismus zur Sicherung der humoralen Erregungsübertragung* recht nahe. Die Noradrenalin-Potenzierung nach Hemmung der Sympathicus-Fasern darf jedenfalls nicht — oder nicht nur — als eine langsam eintretende Degenerationsfolge angesehen werden. Vielmehr scheint die Bedeutung der Cocain-Experimente gerade darin zu liegen, daß sie das *akute Funktionieren* dieses Potenzierungs-Mechanismus erkennen lassen.

Zusammenfassung.

1. Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe (Adrenalin, Noradrenalin, Dioxyphenyläthylamin, Epinin, Corbasil, Dioxyephedrin, Dioxyphenylmorpholin) besitzen an der chronisch denervierten Nickhaut der Katze (Exstirpation des oberen Cervicalganglions) verstärkte Kontraktur-Effekte. Eine ganz ähnliche Potenzierung dieser Stoffe tritt akut nach intravenösen Cocain-Gaben ein. Bestimmte Dosen von Noradrenalin, Epinin und Corbasil wirken an der denervierten oder cocainisierten Nickhaut 30—60mal kräftiger als normal.

2. Die Übereinstimmung im Verhalten denervierter und cocainisierter Nickhäute läßt sich durch Berechnung der „Potenzierungsfaktoren" für einen weiten Dosierungsbereich der verschiedenen Sympathomimetica exakt belegen: Chronisch denervierte und akut cocainisierte Nickhäute reagieren tatsächlich auch in den Einzelheiten identisch.

3. Es wird angenommen, daß Cocain die Aktivität der sympathischen Nervenendigungen bis zu einem — der operativen Denervierung ähnlichen — Grade reduzieren kann („pharmakologische Denervierung") und dadurch alle Folgezustände einer operativen Denervierung akut zu imitieren vermag. Auch die sympathischen „Reizeffekte" von Cocain an der Nickhaut und am M. dilatator pupillae scheinen auf einer Sensibilisierung für Adrenalin bzw. Noradrenalin infolge Dämpfung der sympathischen Nervenfasern zu beruhen.

4. Es wird vermutet, daß die sympathisch innervierte glatte Muskelfaser umso empfindlicher für Noradrenalin und andere Stoffe der Brenzkatechin-Reihe wird, je weniger Noradrenalin von den degenerierenden oder cocainisierten sympathischen Nervenendigungen geliefert werden kann. Der physiologische Sinn dieses — in den Einzelheiten noch dunklen — Potenzierungsmechanismus könnte in der Anpassung der Empfindlichkeit des sympathisch innervierten Endorgans an die jeweils freigesetzten Noradrenalin-Mengen liegen (Sicherheitsfaktor bei der humoralen Erregungs-Übertragung).

Literatur.

Bacq, Z. M.: Arch. internat. Pharmacodynamie **55**, 190 (1937). — Burn, J. H., D. J. Finney and L. G. Goodwin: Biological Standardisation S. 219. London: Geoffrey Cumberlege, Oxford Univ. Press. — Burn, J. H., and J. Robinson: Brit. J. Pharmacol. **7**, 304 (1952). — Burn, J. H., and M. L. Tainter: Brit. J. Physiol. **71**, 169 (1931). — Eichholtz, F., u. G. Hoppe: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **173**, 687 (1933). — Eichholtz, F., A. Fleckenstein u. R. Muschaweck: Klin. Wschr. **27**, 71 (1949). — Euler, U. S. v., u. A. Purkhold: Acta Physiol. Scand. **24**, 212 (1951). — Fleckenstein, A.: Verh. Dtsch. Ges. f. Inn. Med. **55**, 623 (1949). — Fleckenstein, A. (1): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 117 (1953). — Fleckenstein, A. (2): Verh. Dtsch. Ges. f. Inn. Med. **59**, 17

(1953). — Fleckenstein, A., u. J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **8**, 69 (1953). — Fleckenstein, A., R. Muschaweck u. F. Bohlinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 132 (1950). — Fleckenstein, A.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 553 (1952). — Fröhlich, A., u. O. Loewi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **62**, 159 (1910). — Lecomte, J., u. P. Fischer: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 79 (1952). — Ölkers, H. A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 493 (1940). — Philpot, F. J.: Brit. J. Physiol. **97**, 301 (1940). — Poulsson, E.: Heffters Handb. d. exper. Pharmacol. Bd. 2, 1. Hälfte, S. 123. — Schöler: Centralblatt f. pract. Augenheilk. **9**, 28 (1885). — Taubmann, G., u. G. Jung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **156**, 18 (1930).

Dozent Dr. A. Fleckenstein, Pharmakolog. Institut der Universität Heidelberg, Heidelberg, Hauptstraße 47—51.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 157—183 (1953).

Aus der Medizinischen und Nervenklinik (Prof. H. Bohn) und dem Hygiene-Institut (Prof. B. Kemkes) der Justus Liebig-Hochschule Gießen.

Über Penicillinintoxikation*.

Ihre cerebral ausgelösten klinischen Standardsyndrome. Penicillinaseaktivität des Gehirns und weitere Schutzmechanismen.

Von

E. Koch, H. Bohn, F. Heiss und R. Schneider.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. März 1953.)

I. Einleitung.

Das täglich millionenfach angewandte Penicillin (P.) hat sich unter bestimmten Umständen als ein gefährliches Gift bei Mensch und Tier erwiesen. Bei den bisherigen Berichten[1–4, 12–14, 18, 20, 24, 30, 33, 35, 36, 38, 40, 44, 49, 50] über schwere oder sogar tödlich endende toxische Schäden nach P. beim Menschen schien es uns wichtig, hierbei etwaige Beziehungen zu bestimmten Grundleiden aufzufinden, sowie der Frage einer etwaigen Abhängigkeit von angewandter Dosis oder Applikationsart nachzugehen, endlich zu prüfen, ob sich bereits aus dem Schrifttum charakterisierte klinische Bilder für eine P.-Intoxikation herausheben lassen.

Bestimmte Grundleiden, bei denen man in Zukunft mit der P.-Anwendung wegen Gefahr einer möglichen P.-Schädigung hätte entsprechende Vorsicht walten lassen müssen, ließen sich nicht auffinden. P.-Giftbilder wurden beobachtet bei Lues cerebri[36, 39, 40], bei generalisierter Carcinomatose[1], bei Meningitis im abklingenden Krankheitsstadium[2, 3, 13, 14, 18, 30, 40, 44], während wir selbst in je einem Fall von Pneumonie, Sepsis, Agranulocytose im Remissionsbeginn tödliche Vergiftungsbilder sahen. Auch hinsichtlich der Dosis und der Darreichungsart waren keine einheitlichen Beziehungen zu etwa auftretenden P.-Vergiftungen aus dem Schrifttum oder unseren Beobachtungen zu erkennen. — Art und Ablauf der Vergiftungsbilder schienen ganz uneinheitlich und zeigten mehr symptomatisches Gepräge. Eine deutliche Abtrennung von der Auswirkung des Grundleidens war bisher kaum möglich. Die Symptombilder betrafen: Atemstörungen[4], Schnappatmung[1], kollapsartige Zustände[18, 24], Diapedesisblutungen[5–7], Gastroenteritis mit Erbrechen und Durchfällen[31], Reststickstoffsteigerungen[1], schlaffe Paresen bei Injektion in den Bereich des N. ischiadicus[10], Querschnittslähmung bei intralumbaler Injektion[14, 40, 44], Dermatitiden mit Hautjucken[11, 15, 37], urticariaähnliche Überempfindkeitsreaktionen[11, 15, 37], auch verschiedenartige Krampfbilder[1–4, 12–14, 18, 20, 24, 30, 33, 35, 38, 39, 40, 44, 49, 50], die weniger mit der direkten P.-Wirkung, als mit einem allgemeinen Kreislaufkollaps und der plötzlichen Verschlechterung des Grundleidens in Zusammenhang gebracht wurden[1, 38].

* Herrn Prof. K. Hansen zum 60. Geburtstag zugeeignet.

Im Gegensatz zum eben Angeführten sah man bei *intrathecaler P.-Verabreichung* häufiger *bestimmt charakterisierte* Vergiftungsbilder, so daß bereits frühzeitig Warnung vor der intrathecalen Anwendung des P. laut wurde[11, 54]. Zwar war bei dem eigentlichen Anwendungsgebiet, bei der eitrigen Meningitis, die intrathecale P.-Anwendung von bestem Heilerfolg begleitet, solange die Verabreichung auf das akute Stadium mit noch nachweisbarer Liquordrucksteigerung beschränkt wurde[18]. Im abklingenden Stadium der Meningitis mit bereits eingetretenem normalem Liquordruck aber beobachtete man bei über Gebühr fortgesetzter intrathecaler P.-Anwendung schwere, zum Teil tödlich endende generalisierte Krampfbilder[13, 14, 18, 44]. Damit stimmten überein die Ergebnisse systematischer Untersuchungen bei Gesunden, also bei Freiwilligen, die sich für die Versuche zur Verfügung stellten[33], oder auch bei „prophylaktischer" intrathecaler Anwendung des P. nach Myelographie[12]. Hierbei sah man häufiger lang anhaltende heftige Kopfschmerzen[33], Erbrechen[12], Reflexsteigerungen[33], Nackensteifigkeit[33], und öfters mehr oder weniger schwere Krampfbilder[12, 19], die zum Teil unter den Erscheinungen eines Coma[12, 19] tödlich verliefen.

Über dieses differente Verhalten der Gesunden gegenüber den Meningitiskranken hinsichtlich der intrathecalen P.-Anwendung hat man sich frühzeitig Gedanken gemacht und nach den Ursachen gefahndet[33]. Von einigen Autoren wurde die celluläre und chemische Veränderung des Liquors beim Meningitiskranken als Ursache der guten Verträglichkeit des intrathecal gegebenen P. angesehen[53]. *Unsere in vitro Untersuchungen* haben diese Annahme nicht bestätigen können: Nach Zusatz einer bestimmten P.-Dosis zum eiweiß- und zellreichen Liquor vom Meningitiskranken beobachteten wir im biologischen P.-Test (s. Methodik) *keine* Abnahme des P.-Wirkungseffektes, auch nicht nach 3stündlicher Einwirkung bei 37° im Brutschrank.

Die Erklärung für diesen unterschiedlichen P.-Gifteffekt wurde bisher darin gesehen, daß beim Meningitiskranken ein besonders schnelles Abwandern des P. vom caudalen Liquor ins Blut erfolge. Unter diesen Verhältnissen steigt nämlich nach Rammelkamp u. Keefer[33] der P.-*Blut*spiegel des Meningitiskranken schneller und höher an als bei der gesunden Versuchsperson bei gleicher intrathecaler Dosierung. Erst mit Abnahme des gesteigerten Liquordrucks und damit vermindertem Abwandern des P. vom Liquor ins Blut im weiteren Meningitisverlauf trat wieder die Gefahr der Giftwirkung in Erscheinung, wobei es, wie gesagt, auch zu tödlichem Ausgang kam.

Daß es sich bei den über den Liquorweg erzeugten P.-Giftbildern um neurotoxische, wahrscheinlich cerebral ausgelöste Zustände handeln könnte, ließ sich aus der Beobachtung einer gleichsinnigen Abhängigkeit der Latenzzeit und toxischen Wirkungsdosis von der Länge des

Diffusionsweges bei der verschiedenen Applikationsart — intralumbal, suboccipital, intraventriculär — schließen[24, 35, 50]. Auch sprach die eindrucksvolle Generalisation der Krampfbilder sehr für eine cerebrale Auslösung.

Entsprechend den Beobachtungen am Menschen war auch bei Versuchstieren (Hunden, Katzen, Affen)[9, 17, 28, 32, 51] nach Injektion relativ kleiner Mengen P. in den Liquorraum oder auch direkt in die Hirnrinde ein schweres Krampfbild auszulösen. Tonutti u. Matzner[48] bestätigten diese Versuche am kleinen Laboratoriumstier und erzeugten schon mit Injektion geringer P.-Dosen ins Stammhirn regelmäßig „tollwutähnliche" Bilder, wobei viele Tiere im Laufe des Konvulsionsstadiums starben.

Einen weiteren wichtigen Befund erhoben Tonutti u. Matzner[48]. Alle das Krampfbild überlebenden Meerschweinchen gingen später, nach Tagen bis Wochen, doch noch, und zwar unter den Erscheinungen einer schweren „Enteritis", zugrunde. Krampfbild und Enteritis erzeugten die Autoren schon mit *kleinen* Dosen bei *intracerebraler* Verabreichung, während bei *intrakardialer* oder *subcutaner* Anwendungsart relativ *hohe* P.-Dosen notwendig waren. Krampfbilder haben die Autoren bei intrakardialer und subcutaner Injektion jedoch nie beobachtet. Bei der histologischen Untersuchung der toxischen P.-Enteritis sahen sie ausgedehnte Blutumlaufstörungen der Darmwand, massive Exsudationen und schließlich Nekrose des Zottenepithels. Bei diesen P.-Giftbildern — Krampfsyndrom und Enteritis — haben bereits Tonutti u. Matzner[48] an einen neurotoxischen P.-Effekt gedacht, ohne daß sie sich schon auf einen genaueren Mechanismus der Wirkung festlegen konnten. Ihre histologischen Befunde[45–48] erinnerten an klinische Beobachtungen und experimentelle Befunde von Blaich u. Mitarb.[5–7], bei denen nach P. Capillarlähmung und nachfolgende Diapedesisblutungen beim Menschen und auch beim Versuchstier auftraten.

Über die bedeutsamen Untersuchungen von Tonutti u. Mitarb.[45–48] waren wir bei der engen persönlichen Fühlungnahme laufend unterrichtet. Das Problem um die P.-Intoxikation war uns durch drei in unserer Klinik beobachtete P.-Todesfälle besonders nahe gerückt. Einer Anregung von Tonutti[45] folgend haben wir uns daher seit 2 Jahren in eigenen Experimentaluntersuchungen, zum Teil mit neuartiger Methode, mit der Aufklärung der neurotoxischen Wirkung befaßt.

Unsere erste Aufgabe sahen wir in der Aufklärung der bekannten unterschiedlichen P.-Empfindlichkeit verschiedener Tierarten. Hierbei war die hochgradige P.-Giftempfindlichkeit des Meerschweinchens dem fast fehlenden Gifteffekt bei der Ratte (und beim Menschen) gegenüberzustellen. Auf dem Wege der Aufklärung dieser Resistenzunterschiede gegenüber dem P. hofften wir dem Wesen der P.-Intoxikation, ihrem Angriffsort und ihrem klinischen Erfolgsbilde auf die Spur zu kommen.

II. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Aufklärung der P.-Intoxikation.

A. Methodisches Vorgehen.

Verwandt wurden 360 Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von 280 bis 400 g, 12 Meerschweinchen mit einem Gewicht von 600—1100 g, sowie 140 weiße Ratten mit einem Gewicht von 100—200 g. Das P. wurde in allen Versuchen als *einmalige* Injektion verabfolgt. Als Präparat benutzten wir das weiße kristalline Na-Penicillin G Hoechst (P. anderer Herkunft zeigte gleich etoxische Wirkung[27, 43, 18]).

Wir wählten folgende Injektionsarten:

Intramuskulär. Gabe in den Pectoralis. Auflösung der wechselnden P.-Mengen in 0,6—1 cm³ physiologischer Kochsalzlösung.

Intrakardial. Äthernarkose, Injektion mittels feiner Kanülen durch die Thoraxwand hindurch und in physiologischer Kochsalzlösung von 0,5—0,7 cm³.

Intracarotical. Äthernarkose, Freilegung der rechten Carotis und 1. Unterbindung gleich oberhalb der Pleurakuppe, dann distal der Ligatur Einführen einer stumpfen Kanüle Nr. 20 in das leicht eingeschnittene Gefäß und Injektion wechselnder in 0,1—1 cm³ physiologischer Kochsalzlösung enthaltener P.-Menge, schließlich, zur Vermeidung von Nachblutungen 2. Ligatur des Gefäßes auch distal der Injektionsstelle. Um nicht etwa anoxämisch bedingte Zustände fälschlicherweise dem P. zur Last zu legen, führten wir Kontrollversuche, bestehend in Ligatur einer Carotis und Injektion physiologischer Kochsalzlösung aus: Es traten keinerlei Krankheitszeichen auf. Sogar Abbinden beider Carotiden wurde einige Stunden ohne Auftreten anoxämischer Krampfsymptome überlebt.

Intracerebral (Technik wie Tonutti[48]). Äthernarkose, Freilegung der Coronarnaht, Durchbohren des Schädeldaches mittels feinen Zahnbohrers unmittelbar vor der Coronarnaht und etwas seitlich der Medianlinie, Einführen einer feinen Kanüle senkrecht zur Schädelbasis, Injektion wechselnder P.-Dosen, die in 0,02 physiologischer Kochsalzlösung gelöst waren. — Kontrollversuche mit Injektion von Kochsalz-, Hyaluronidaselösung sowie Aureomycinsuspensionen hatten keine toxischen Erscheinungen zur Folge.

Dosierung und Versuchsarten bei Meerschweinchen und Ratten sind den Tab. 1 und 2 sowie den Abb. 1—3 zu entnehmen.

Entblutung des Hirnes. Zum biologischen P.-Nachweis im Hirn ist maximale Hirnentblutung erforderlich, da das im Hirnblute enthaltene P. sonst fälschlicherweise mitbestimmt würde. Nach verschiedenen Zeiten (30—240 min) wurden beide Jugularvenen eröffnet und noch während der Ausblutung mit 0,5 Liter körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung unter gleichbleibendem Druck über den linken Ventrikel langsam nachgespült. — Die Hirne schimmerten bei guter Entblutung alabasterweiß, weniger sorgfältig entblutete und noch rötlich schimmernde Hirne wurden verworfen. Etwa der Hirnoberfläche noch anhaftende kleine Blutreste wurden abgespült.

P.-Nachweis. Das Gehirn wurde unter sterilen Kautelen entnommen, mit Meersand fein zerrieben und in 2—4 cm³ redestilliertem Wasser aufgeschwemmt. Nach dem Zentrifugieren (5 min bei 1500 Umdrehungen/min) wurde mit der überstehenden Flüssigkeit der bekannte *Röhrchenverdünnungstest*[44] angestellt. Als Teststamm diente der hämolysierende Streptococcus E XIII, dessen Resistenz gegen Standard-P. in *jeder* Untersuchungsreihe neu überprüft wurde. Der P.-Gehalt wurde auf 1 g Hirngewebe umgerechnet. — Die P.-Werte im Blutserum bestimmten wir in ganz entsprechender Weise.

B. Bestimmung der letal wirkenden P.-Dosen beim Meerschweinchen nach unterschiedlicher Applikationsart.

Wie erwähnt, hatten schon TONUTTI u. MATZNER festgestellt, daß beim Meerschweinchen immer das gleiche Krankheitsbild der Enteritis auftrat, ob man nun kleine P.-Dosen direkt intracerebral oder größere Dosen subcutan bzw. intrakardial gab. Zunächst bemühten wir uns um eine genauere Festlegung der letal wirksamen Dosen, auch ihrer Grenzwerte, unter Erweiterung der bisher angewandten Applikationsarten (Abb. 1).

Bei *intramuskulärer Gabe* bis 20000 E/kg (16 Tiere) erholten sich unsere Tiere nach Überwindung einer akuten Schädigung mit dem Bilde des Struppigwerden des Haarkleides, des akuten Gewichtsverlustes und der gelegentlichen durchfälligen Stühle bald wieder. Dosen von 80000 E/kg und darüber wirkten bei 90% der Tiere tödlich (150 Meerschweinchen).

Intrakardiale Gaben von 6000—10000 E/kg verursachten nach den bereits vorliegenden Befunden von TONUTTI u. MATZNER bei 80% der Meerschweinchen (30 Tiere) eine tödlich ausgehende Enteritis. Die Unterschiede in der Höhe dieser letal wirksamen Dosen sind unseres Erachtens darauf zurückzuführen, daß bei direkter Gabe des P. in die Blutbahn der P.-Spiegel höher ansteigt als bei intramuskulärer Gabe.

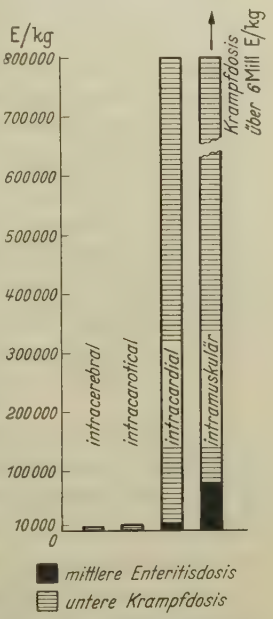


Abb. 1. Wechselnde Applikationsweisen u. sehr unterschiedliche P.-Mengen lösen identische Krankheitsbilder — Enteritis, Krampfsyndrom — beim Meerschweinchen aus.

Besonders auffallend war aber, daß wir schon mit deutlich kleineren Dosen von 1200—2000 E/kg in die *Carotis* bei 90% der Tiere (20 Meerschweinchen) das tödlich verlaufende Enteritissyndrom hervorrufen konnten, während ja — wie gesagt — bei intrakardialer Gabe die tödliche Enteritis 6000—10000 E/kg erforderlich machte. Der Schluß schien uns naheliegend, daß für die toxische Wirkung nur *jene* P.-Menge maßgeblich ist, die unter Umgehung des allgemeinen Blutkreislaufs und eines P.-Verlustes in andere Gewebe und Körperflüssigkeiten direkt über die Carotis dem Cerebrum zugeführt wird. Im Einklang damit waren mit den minimalen Dosen von 350 E/kg bei direkter *intracerebraler* Injektion neben dem klassischen Krampfsyndrom später stets eine tödliche Enteritis auszulösen (TONUTTI u. MATZNER). Unsere Nachuntersuchungen mit der halben P.-Dosis (100—160 E/kg) ließen bei 11 von 12 Meerschweinchen das Enteritisbild mit tödlichem Ausgang in Erscheinung treten, während bei dieser herabgesetzten Dosis das Krampfsyndrom meist ausblieb.

Schon diese ersten Untersuchungen sprechen unseres Erachtens dafür, daß die geschilderte Eigenart der Beziehungen zwischen Applikationsweise und toxischer Dosis damit zu erklären ist, daß offenbar nur jene das Gehirn selbst erreichende P.-Menge für das Krankheitsbild der P.-Vergiftung, also auch für die spät einsetzende toxische Enteritis verantwortlich zu machen ist. Schon diese Überlegungen schienen somit *für einen primär cerebralen Angriffsort* des toxischen P.-Effektes zu sprechen.

Wenn diese Annahme eines primär cerebralen Angriffsortes des toxischen P.-Effektes zutreffen sollte, so mußte unseres Erachtens die quantitative P.-Bestimmung in der Hirnsubstanz bei den P.-vergifteten Tieren darüber Auskunft geben. Daneben erwarteten wir von diesen Untersuchungen Aufklärung über die *unterschiedliche* Empfindlichkeit der beiden Tierarten (Meerschweinchen und Ratten) gegenüber reiner P.-Intoxikation.

Bevor solche Untersuchungen durchzuführen waren, mußte man sich Klarheit darüber verschaffen, ob bei dem handelsüblichen P.-Präparat das P.-Molekül selbst oder ein Begleitstoff für die toxische Wirkung verantwortlich zu machen ist, andererseits, ob das P. unmittelbar oder erst über sekundär im Organismus gebildete endogene Giftprodukte toxisch wirkt.

C. Spezifische oder unspezifische P.-Wirkung als Ursache der Vergiftungsbilder.

Im Schrifttum wurde die Frage behandelt, ob es sich bei der P.-Vergiftung um eine spezifische Wirkung des P.-Moleküls oder um einen bei der Aufbereitung entstandenen oder mitgeführten unspezifischen Wirkstoff handele.

1. Experimentelle Untersuchungen von Miescher und Böhm[27].

Miescher u. Böhm gingen der Frage der besonderen P.-Empfindlichkeit der Meerschweinchen auf folgende Weise nach: Sie gaben normalen Meerschweinchen P. intramuskulär und excidierten 48 Std später den mit P. beschickten Muskel, zerrieben ihn zu einem feinen Brei und injizierten den Muskelbrei anderen Meerschweinchen wiederum intramuskulär. Die Empfängertiere erkrankten dann nach einigen Tagen mit hämorrhagischer Diathese in Lungen und Nebennieren und anderen Organen sowie mit Fieber. Da die Autoren in dem übertragenen Muskelbrei kein biologisch aktives P. mehr nachweisen konnten, das das toxische Bild beim Empfängertier hervorgerufen hätte, so schlossen sie, daß die Giftwirkung „durch chemische Veränderungen des P." oder durch „die Bildung endogener Wirkstoffe unter dem Einfluß des P. im Spenderorganismus" entstanden sei. Zu dieser Auffassung kamen sie auch deshalb, weil der Muskelbrei nur dann einen Gifteffekt auslöste, wenn der mit P. beschickte Muskel genau 48 Std nach der P.-Injektion zur Weiterverarbeitung entnommen war. Wurde der Muskel früher als 24 oder später als 72 Std nach der Injektion entnommen, so ergab sich keinerlei Wirkung beim Empfängertier. Diese ihre Auffassung über die indirekte Giftwirkung des P. im Organismus durch Bildung endogener toxischer Wirkstoffe sollte nach den Autoren auch für die tödlich ausgehende P.-Wirkung beim Meerschweinchen verantwortlich sein.

2. Hierzu eigene experimentelle Untersuchungen und Stellungnahme zu Miescher und Böhm.

In eigenen experimentellen Untersuchungen mit etwas geänderter Methodik gingen wir der Fragestellung von Miescher u. Böhm nach. Wir wandten höhere und sicher letal wirksame intramuskuläre Dosen an (100000 E/kg). Die Übertragungsversuche auf ein gesundes Empfängertier erweiterten wir durch Anwendung nicht nur des mit P. beschickten Muskelbreies, sondern auch durch Herstellung und Injektion eines Hirnbreies desselben Tieres, dem das P. intramuskulär (nicht ins Hirn!) gegeben war. Den so hergestellten Muskel- und Hirnbrei halbierten wir zu Kontrollzwecken, um 4 Empfängertiere (je 2 mit Muskel- und je 2 mit Hirnbrei) beschicken zu können.

Am 3.—4. Tage post inj. erkrankten die Tiere mit Kurzatmigkeit und Temperatursteigerung. Sie starben zwischen dem 8. 18. Versuchstage, jedoch ohne daß als Ausdruck einer etwa eingetretenen Enteritis durchfälliger Stuhl abgesetzt worden wäre. Nur 6 von 30 Tieren überlebten. Die Sektion der 24 verstorbenen Tiere bot keine Zeichen einer Enteritis, dafür aber massive Lungenblutungen und diastolischen Herzstillstand, und der terminal bestimmte Blutzucker war manchmal nicht, manchmal deutlich, in einem Fall bis 38 mg% abgesunken.

Auf Grund unserer Beobachtungen war uns klar, daß bei den Übertragungsversuchen nach Miescher u. Böhm *nicht das Bild der P.-Vergiftung vorlag*, sondern ein *unspezifisches Giftbild*. Es gelang uns dann auch mit Muskel- und Hirnbrei von *nicht* mit P. behandelten Meerschweinchen bei 10 Empfängertieren das gleiche Krankheitsbild mit dem gleichen Sektionsbefund auszulösen: 6 der 10 Tiere starben innerhalb 12 Tagen mit dem Bilde der Hyperthermie und massiven hämorrhagischen Diathese.

Unsere Nachprüfungen der Befunde von Miescher u. Böhm haben also sichergestellt, daß eine von den Autoren vermutete Freisetzung endogener Wirkstoffe durch P. als Ursache der P.-Vergiftung nicht vorliegen kann. Die andere von den Autoren angeschnittene und auch für uns dringend wichtige Frage, ob das P.-Molekül selbst oder aber ein Umbaustoff des Moleküls für die toxische Wirkung verantwortlich gemacht werden kann, ist weder durch Miescher u. Böhm, noch durch unsere vorstehenden Untersuchungen bisher einer Klärung zugeführt worden.

Es war also die Frage zu klären, ob der antibiotische mit dem toxischen Wirkungseffekt des P. identisch sei. Im zutreffenden Falle wären wir dann in der Lage, das P. und seinen Wirkungsgrad in den einzelnen Organen und Körperflüssigkeiten auf Grund seines antibiotischen Effektes im Bakterien-Testverfahren zu verfolgen und so auf einen parallel laufenden toxischen Wirkungseffekt zu schließen.

3. Nachweis der Identität der antibiotischen und der toxischen Wirkung des P.

Bei der experimentellen Bearbeitung der zuletzt genannten Fragestellung ließen wir biologisch inaktives, d. h. antibiotisch unwirksam gemachtes P. in steigenden bis zu beliebig hohen Dosen auf den Organismus einwirken, um zu prüfen, ob von einer bestimmten Dosis an ein toxischer Wirkungseffekt erfolgt.

Den Vorgang der biologischen Inaktivierung erzielten wir auf *zweierlei* Weise, entweder durch 2stündiges Erhitzen auf 100° oder durch Zusatz einer geeigneten Penicillinaselösung, wie sie von den *Bayer-Werken* aus Bacterium Coli-Stämmen gewonnen und uns dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurde. Bei jedem Versuchsansatz überzeugten wir uns im Bakterien-Testverfahren von der biologischen Unwirksamkeit der so veränderten P.-Lösung.

Diese unsere Untersuchungen zeigten, daß bei intracerebraler Verabreichung selbst von größten Dosen (10000—15000 E/kg) an 4 Meerschweinchen und 4 Ratten jeder toxische Wirkungseffekt ausblieb. Die doppelte Dosis von so unwirksam gemachtem P. wurde 8 Tieren intracarotical mit dem gleichen negativen Ergebnis einverleibt. Weitere 6 Meerschweinchen reagierten auf intramuskuläre Gabe von 100000 E/kg ebenfalls völlig negativ, d. h. es traten wiederum keine P.-Gifterscheinungen (z. B. Enteritis) auf.

Gewissermaßen als Kontrolle dieser Versuche können jene Beobachtungen gelten, bei denen wir *absichtlich eine nicht vollständige Inaktivierung* der P.-Lösung vorgenommen hatten. Bei kleinen und mittleren Dosen zeigten sich auch dann noch keine sicheren toxischen Effekte; dagegen bei großen Dosen, intracerebral gegeben, sahen wir eindeutige Krampfbilder bei 6 Meerschweinchen und Ratten auftreten. Die zur Injektion verwandte ursprüngliche P.-Lösung enthielt 800 E/0,02 cm³(- 2500 -5000 E/kg). Auf Grund unserer Erfahrungen im Tierversuch schätzten wir am auftretenden Krampfbild den noch nicht zerstörten und daher toxisch wirkenden P.-Anteil auf etwa 100 E pro Tier (300—600 E/kg). Bei der nachträglichen Austestung der angewandten Lösung ergab sich in guter Übereinstimmung eine antibiotische Wirkung von 90 E/0,02 cm³.

Die vorstehenden experimentellen Untersuchungen scheinen die Auffassung zu sichern, daß im Bereich der angewandten und zum Teil sehr hohen Dosen der *antibiotische und der toxische Wirkungseffekt durch das P.-Molekül selbst zustande* kommt.

Durch diese Untersuchungen wird auch eine von amerikanischen und schweizer Autoren[21, 27] geäußerte Vermutung, wonach möglicherweise Verunreinigungen im P. damaliger Aufbereitungsart (in den Jahren 1943 bis 1948) mit dem Auftreten des toxischen Effektes auf Meerschweinchen in Zusammenhang stehen könnte, im negativen Sinne entschieden. Vielmehr bestätigen unsere Befunde jene von Pichler, Meacham u. Smith[32], welche mit biologisch inaktiviertem P. (durch Erhitzen) bei intracerebraler Injektion an verschiedenen Tieren keinerlei toxische Bilder (Krämpfe) auftreten sahen.

In Fortsetzung dieser Versuchsreihe sind wir mit Absicht bis zu unsinnig hohen Dosen von P. heraufgegangen, das auf beide Arten inaktiviert und im Tierversuch angewandt wurde. So wurden intramuskuläre Gaben von 400000—600000 E/kg bei 12 Meerschweinchen angewandt. Bei 10 der Tiere kam es unter diesen extrem hohen Dosen von inaktiviertem P. zu schwersten Organveränderungen und zum Tode nach 2—12 Tagen. Das klinische und pathologisch-anatomische Bild glich in keiner Weise dem Bilde der von uns eingehend studierten P.-Intoxikation

(s. spätere Ausführungen): Blutungen in Lunge, Leber, Uterus, gelegentlich auch in stark geblähten Darmschlingen wurden beobachtet. Daß es sich bei diesen dramatisch ablaufenden Vergiftungsbildern generalisierten Ausmaßes um etwas ganz anderes handelte, als um die eigentliche P.-Giftwirkung, konnten wir bestätigen durch Nachweis eines Prothrombinabsturzes im Blute bis auf 30% und zuletzt 5% des Normalwertes (Methode nach QUICK). Eine Bestätigung dieser Annahme ergab sich auch daraus, daß bei intracerebraler Verabreichung von verhältnismäßig riesigen Dosen inaktivierten P. (bis 5000/0,02 cm³) kein Wirkungseffekt erzielt wurde. Wir nehmen hier das später mitzuteilende Ergebnis unserer Befunde vorweg, wonach die P.-Intoxikation keinen peripheren, sondern nur einen zentral-cerebralen Angriffspunkt hat. Die Entstehung der ganz andersartigen Giftbilder nach Gabe dieser extrem großen Dosen von inaktiviertem P. hat uns nicht weiter beschäftigt. Wir halten es durchaus für wahrscheinlich, daß es sich in diesem Extremfalle mit Anwendung größter Mengen von inaktiviertem P. doch um toxische P.-Umbaustoffe handeln kann.

D. Der zentral-toxische Angriffsort des P.

Unsere Untersuchungen sichern also die Annahme, daß der toxische und der antibiotische Wirkungseffekt auf das P.-Molekül selbst zurückzuführen sind. — Damit bestand nun die Möglichkeit, die Austestung der P.-Konzentration in den Organen und Körperflüssigkeiten, vor allem der Gehirnsubstanz, nach verschiedenartiger P.-Verabreichung im Bakterien-Testverfahren zu verfolgen.

1. P.-Spiegeluntersuchungen im Hirngewebe.

Wir gingen so vor, daß wir den Tieren P. i. m. verabfolgten und zwar derart, daß eine Meerschweinchenserie subletale, eine andere sicher letal wirksame Dosen erhielt. Auch eine Rattenserie erhielt entsprechende Dosen. Eine weitere Rattenserie erhielt 3- bis 5-fach überhöhte Gaben.

Die Dosierung betrug also:

Bei 35 Meerschweinchen	20000— 80000 E/kg,
bei 38 Meerschweinchen	80000—150000 E/kg,
bei 15 Ratten	80000—130000 E/kg,
bei 25 Ratten	400000—500000 E/kg.

Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten und zwar in Gruppen von 3—5 in viertelstündlichen Abständen zwischen der 30.—240. min getötet, und der P.-Gehalt im maximal entbluteten Hirn ausgetestet (s. Methodik).

Bei allen Versuchen wurde der P.-Blutspiegel mitbestimmt und dabei *keine* Abweichungen gegenüber dem bisher Bekannten festgestellt. Vor allem ergaben sich keine Unterschiede bei den beiden Tierarten.

Bei unseren P.-Bestimmungen in dem *Hirn*brei von Ratten und Meerschweinchen ergaben sich *eindeutig unterschiedliche* Befunde: Selbst nach den sehr hohen intramuskulären P.-Gaben konnten wir im Rattenhirn keinerlei P. nachweisen*. Dagegen war im Meerschweinchenhirn

* Unter 25 Ratten der Serie mit sehr hohen P.-Mengen wurde bei 3 Tieren nach 45—90 min ein Grenzwert von 0,06 E/g (= untere Grenze der Bestimmungsmöglichkeit) im Hirn bestimmt. Da aber die Blutspiegel dieser Ratten mit über 400 E/cm³ besonders hoch lagen, könnte unter diesen Umständen das Vorhandensein auch winziger Blutreste in den gewaschenen Hirnteilen genügen, um Spuren eines primären P.-Hirnspiegels vorzutäuschen.

selbst bei der wesentlich kleineren intramuskulären Dosis regelmäßig (bei 35 Tieren nur eine Ausnahme) P. in deutlicher bis großer Menge aufzufinden. Der Größenordnung nach betrug die ausgetestete Menge 0,06 bis 0,7 E/g Hirnsubstanz (s. Abb. 2). Nach sehr niedrig gehaltener P.-Dosis, bei der mit einem sicheren neurotoxischen Effekt nicht unbedingt zu rechnen war, fanden sich noch bei 7 von 35 Meerschweinchen in den ersten Stunden nach Injektion Werte von 0,06—0,2 E/g. — Das P. hält sich nicht beliebig lange im Cerebrum auf. Selbst nach den hohen Dosen von 150000 E/kg intramuskulär war 4 Std post inj. im Meerschweinchenhirn *infolge Abtransports auf dem Blutwege* kein P. mehr nachweisbar.

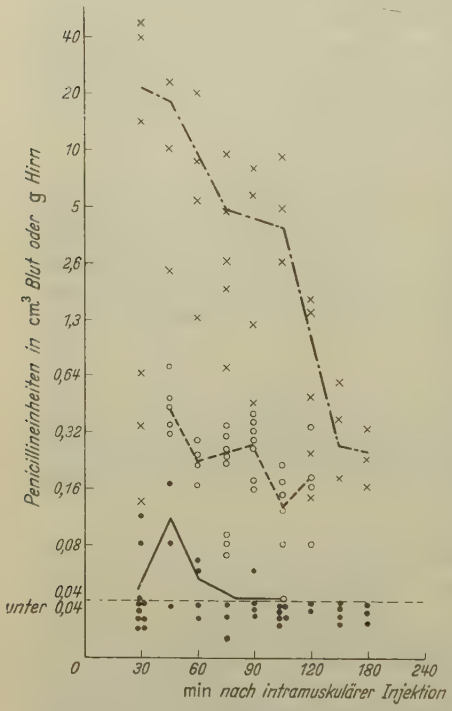


Abb. 2. Blut- und Hirn-P.-Spiegel beim Meerschweinchen.
Nach 20000—80000 E/kg im Hirn ——••,
„ „ „ „ „ im Blut - • - •× ×.
Nach 80000—150000 E/kg im Hirn - o - o.

Das unterschiedliche Verhalten des Meerschweinchen- gegenüber dem Rattenhirn bei den angeführten Versuchen könnte einmal darauf beruhen, daß das intramuskulär gegebene P. bei der unempfindlichen Ratte den Weg ins Hirn nicht finden kann (Unüberwindlichkeit der Blut-Hirnschranke). Sodann wäre mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das P. wohl ins Gehirn der Ratte eindringen kann, hier aber in seiner Wirkung gedämpft oder sogar zerstört wird. Bei dieser Annahme müßten dann derartige Dämpfungs- bzw. P.-Zerstörungsfaktoren im Meerschweinchenhirn fehlen.

2. Nachweis einer Blut-Hirnschranke gegen P.

Die von Spatz[41] auf Grund seiner bekannten Farbstoffversuche im Endothel der Blutgefäße des Hirns lokalisierte Barriere dürfte in der menschlichen Pathologie gegenüber verschiedensten Toxinen, artfremdem Eiweiß, sowie Pharmaka, eine Rolle spielen. Auch gegenüber dem P. besteht auf Grund nachfolgender Versuche diese Barriere: Nach intramuskulären Gaben unter 80000 E/kg beim *Meerschweinchen* fanden wir zwar einen recht hohen Blutspiegel, aber entweder kein oder in nur sehr geringer Menge nachweisbares P. im Gehirn (Abb. 2). Daraus beweist sich die gegenüber verhältnismäßig kleinen P.-Dosen ausreichende

Schutzwirkung der „Bluthirnschranke". Sie wird erst durchbrochen bei größeren intramuskulären Gaben (über 80000 E/kg), wobei dann als Spätwirkung die neurotoxische Enteritis beobachtet werden konnte. Gegenüber diesen großen Dosen bot die Bluthirnschranke also keinen ausreichenden Schutz mehr: Zwar verhinderte sie selbst bei den gewaltigen Dosen von 8 Mill. E/kg intramuskulär noch das Krampfbild, aber nicht mehr den Ausbruch der cerebral toxischen Enteritis, die also schon bei kleineren Hirn-P.-Konzentrationen zu beobachten ist. Direkte Gabe von P. ins Gehirn führte schon in sehr kleiner Dosis zum schweren Krampfbild. Die P.-Dosis mußte um das 1000fache gesteigert werden, wenn ein Krampfbild durch intracaroticale Injektion erzeugt werden sollte. Auch hieraus ergibt sich eine eindeutige, wenn auch nicht voll ausreichende Schutzwirkung der Blut-Hirnschranke beim P.-empfindlichen Meerschweinchen.

Diese Schutzwirkung der Blut-Hirnschranke gegenüber der P.-Intoxikation muß auch bei der Ratte eine wesentliche Rolle spielen, wie sich aus dem extrem hohen Blut- gegenüber dem besonders niedrigen Hirnspiegel bei intracaroticaler P.-Injektion ergeben hat. Derartig hohe Blut-P.-Konzentrationen, wie sie erforderlich sind, um einen toxisch wirksamen P.-Spiegel im Hirn zu erzielen, erreicht man niemals bei intramuskulärer Injektion von P., das dann durch die weit stärkere Verdünnung infolge Abwanderung ins Gewebe bei der Ratte unterschwellig bleibt.

Hierzu folgende Untersuchungen: Bei beiden Tierarten wurde zunächst die mit Sicherheit krampfauslösende Dosis für die intracaroticale Verabreichung ermittelt. Bei der Ratte war eine fast doppelt so hohe Dosis nötig wie beim Meerschweinchen. 5 Meerschweinchen erhielten die vollwirksame Dosis von 600000 E/kg, 5 Ratten 1 Mill. E/kg, jedesmal gelöst in 0,6 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung. Ein heftiges Krampfbild entwickelte sich jedesmal bei allen Tieren. Diese wurden 15 min nach Injektion getötet, das Hirn entblutet und entnommen (s. Methodik) und der P.-Hirnspiegel jeder Hirnhälfte (zu Kontrollzwecken) getrennt bestimmt. Er schwankte bei beiden Tierarten gleichmäßig zwischen 0,7—4 E/g. In die genannte Schwankungsbreite geht ein die Beobachtung bei 3 Tieren (2 Ratten und 1 Meerschweinchen), daß die der Carotis (in die die Injektion erfolgt war) seitengleiche Hirnhälfte einen niedrigeren P.-Spiegel aufwies als die Gegenseite, was vielleicht mit verschiedenen Diffusionsverhältnissen erklärt werden kann.

3. Nachweis einer Penicillinaseaktivität nur im Rattenhirn, nicht im Meerschweinchenhirn.

Die eben beschriebene Schutzwirkung der Blut-Hirnschranke besteht also zweifellos bei beiden Tierarten, Meerschweinchen und Ratte. Sie erklärt jedoch nicht die unterschiedliche Empfindlichkeit der Tierarten gegenüber dem toxischen P.-Effekt. Denn bei Injektion sehr großer P.-Dosen in die Carotis treten *unterschiedslos* bei Meerschweinchen und Ratten heftige generalisierte Krämpfe auf, die tödlich enden. Bei in Grenzen gehaltenen intracaroticalen Dosen aber überwinden beide Tierarten die Krampfphase, und während es bei den Ratten niemals zur späteren Enteritis kommt, tritt beim Meerschweinchen das Spätbild der

Enteritis regelmäßig auf. Gibt man endlich, unter Umgehung der Blut-Hirnschranke, das P. direkt ins Hirn, so ist trotzdem die Unterschiedlichkeit des Verhaltens der beiden Tierarten gegenüber P. noch nicht aufgehoben. Eine doppelt so große Dosis ist bei der Ratte für den toxischen Effekt des Krampfbildes notwendig wie beim Meerschweinchen. Werden bei dieser intracerebralen Applikation Dosen angewandt, die zwar das Krampfbild bei beiden Tierarten erzeugen können, jedoch nicht unmittelbar letal wirken, so entwickelt sich analog der Beobachtung nach der intracaroticalen Applikation beim Meerschweinchen regelmäßig das Spätsyndrom der Enteritis, während die Enteritis bei der Ratte regelmäßig vermißt wird.

Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, daß neben dem bei beiden Tierarten wirksamen Mechanismus der Blut-Hirnschranke *noch ein weiterer Schutzmechanismus bei der Ratte* im Gegensatz zum Meerschweinchen vorhanden sein muß, der nur im unterschiedlichen Verhalten der Hirnsubstanz selbst gesucht werden kann. Dieser weitere für die P.-Giftwirkung offenbar *ausschlaggebende Schutzeffekt* muß mit einem bestimmten Zeitfaktor seines Wirkungsoptimums verbunden sein, weil er bei plötzlicher P.-Überschwemmung des Hirns (mittels intracerebraler oder intracaroticaler Gabe) bei der Ratte zunächst ungenügend, im Laufe kürzerer Zeit jedoch zur vollen Wirkung kommt. So erklärt sich bei der Ratte das erwähnte Ausbleiben des toxischen Spätsyndroms der Enteritis.

In Verfolgung dieser Überlegungen kamen wir auf eine bisher im Schrifttum noch nicht erörterte Frage, *ob im Hirngewebe der Ratte* (dem Beispiel einer P.-unempfindlichen Tierart) *eine P. zerstörende Kraft vorhanden sei*, die dann dem Meerschweinchengehirn fehlen müßte. Unsere darauf hingehenden Untersuchungen führten in der Tat zur *Aufdeckung dieser vermuteten Penicillinaseaktivität im Hirngewebe der Ratte*, die sowohl in vitro als auch in vivo biologisch wirksam war, und die in der Hirnsubstanz des Meerschweinchens völlig vermißt wurde.

Unsere Versuche. Injizierte man P. unter Umgehung des Blutweges (und damit der Blut-Hirnschranke) unmittelbar intracerebral (100 E/Tier) und bestimmte nach 30—90 min die P.-Spiegel im entbluteten Hirn, so ergab sich folgendes: Die blutfrei gemachte Hirnsubstanz des Meerschweinchens zeigte nach Verlauf 1 Std noch erhebliche Mengen P. (10—70% der injizierten Dosis), während im Rattenhirn nach derselben Zeit nur noch geringe Mengen oder überhaupt kein P. (0—20%) gefunden wurde (Abb. 3). Das Verschwinden eines großen P.-Anteils im Rattenhirn schon kurze Zeit nach intracerebraler Injektion kann in zwei Ursachen gelegen sein. Einmal könnte das P. besonders schnell vom Hirn ins Blut abwandern. Zum anderen könnte eine schnell eingreifende P.-zerstörende Kraft, eine Penicillinaseaktivität, im Hirngewebe der Ratte vorliegen.

Über den ersten Punkt mußte die gleichzeitige Bestimmung des Blut-P.-Spiegels Auskunft geben. Zur Erzielung eines etwa gleich hohen Blut-P.-Spiegels bei *intracerebraler* P.-Injektion waren beim Meerschweinchen 250—300 E/kg, bei der Ratte 700—800 E/kg erforderlich. Demnach lag bei der Ratte sogar ein deutlich geringeres Abströmen des P. vom Hirn ins Blut als beim Meerschweinchen vor, was offenbar auf die vermutete P.-zerstörende Kraft im Hirngewebe bezogen werden mußte.

Der Nachweis und die Feststellung des Wirkungsgrades dieser Penicillinaseaktivität konnte *durch in vitro-Versuche am Hirnbrei der Ratte* gegenüber dem des Meerschweinchens endgültig sichergestellt werden. Nur der Hirnbrei der Ratte (insgesamt 20 Versuche) war imstande, selbst große Dosen von P. (= 100—300 E/g Hirnsubstanz) im Laufe von höchstens 3 Std zu zerstören. Die Hemmung war in den ersten Viertelstunden am ausgesprochensten, um dann schnell abzunehmen und nach der 3. Std praktisch auf Null zu sinken. Erhitzen des Hirngewebes 20 min lang vor P.-Zusatz auf 60° führte zu einer Einschränkung der Penicillinaseaktivität auf die Hälfte, Erhitzen auf 80° zu einer vollständigen Aufhebung des Effektes.

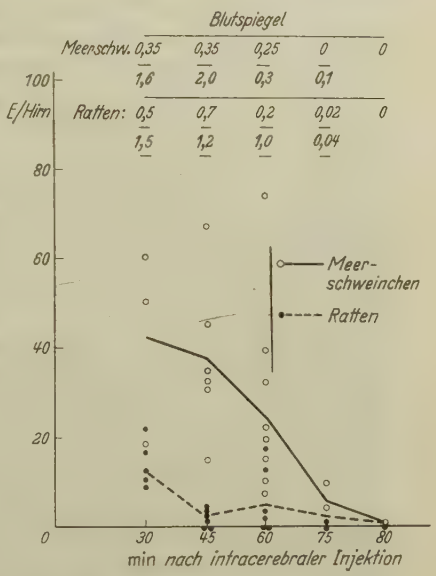


Abb. 3. Hirnspiegel bei der Ratte und beim Meerschweinchen nach intracerebraler Gabe von 100 E/g Tier. Die entsprechenden P.-Blut-Spiegel sind im oberen Teil der Abb. eingetragen.

Hingegen vermochte Hirnbrei von Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von 300—400 g die bakteriostatische Wirkung größerer (100 E) oder selbst kleinster Mengen (0,2 E) innerhalb 3 Std *nicht* herabzumindern.

Eine wichtige und interessante Ausnahme machten dabei die Hirngewebe besonders *alter* Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von 800—1100 g: Hier war eine gewisse Hemmung der antibiotischen Wirkung von zugesetztem P. (100 E) um 10—40 E in 3 Std festzustellen. Dies stimmt mit den von Tonutti mitgeteilten[45] sowie unseren eigenen Beobachtungen bei einigen Tieren überein, wonach *alte* Meerschweinchen im Vergleich zu jüngeren Tieren sich gegen toxische P.-Dosen resistenter verhalten.

Da *Kaninchen* genau wie Ratten zu den P.-unempfindlichen Tieren gehören, haben wir auch das Hirngewebe der Kaninchen auf Penicillinaseaktivität untersucht und, wie vermutet, einen erheblichen Schwund

des zum Hirnbrei zugesetzten P. (100—300 E/g Organbrei), also eine hochwirksame Penicillinaseaktivität, festgestellt.

Aus vorstehender Untersuchungsreihe ist die bisher ungeklärte Frage der *unterschiedlichen P.-Empfindlichkeit der Meerschweinchen gegenüber den Ratten* einer *endgültigen Klärung* zugeführt worden: Sie liegt in dem von uns geführten Nachweis einer *Penicillinaseaktivität der Hirnsubstanz nur bei der Ratte* (bzw. des Kaninchens als weiterem Beispiel einer P.-unempfindlichen Tierart), die der Hirnsubstanz des Meerschweinchens völlig fehlt.

Während also die Penicillinaseaktivität bei den P.-unempfindlichen Tierarten, und wohl auch beim Menschen, als wichtigster Schutzmechanismus gegenüber einer P.-Intoxikation zu gelten hat, konnten wir einen weiteren — unvollständigen — Schutz in der Blut-Hirnschranke für beide Tierarten nachweisen.

4. Penicillinaseaktivität in der Leber.

Der Gedanke an eine in der *Hirnsubstanz* vorkommende und als Schutzwirkung gegenüber einer P.-Intoxikation verantwortliche Penicillinaseaktivität ist von uns erstmals geäußert und dann — wie gezeigt — bestätigt worden. Vor uns haben schon Irrgang u. Dörnbrack[23] nach einer Penicillinaseaktivität in der *Leber* gesucht und sie auch gefunden.

Diese an Kaninchen durchgeführten Untersuchungen haben wir auf unsere Tiere, Meerschweinchen und Ratten, übertragen und fanden in der Tat auch in der Rattenleber einen P.-zerstörenden Faktor in der Größenordnung von 100—300 E/g Organbrei, in der Meerschweinchenleber von 10 E/g Organbrei für die Wirkungsdauer von 3 Std.

Auffallenderweise ist die Penicillinaseaktivität der Leber beim Meerschweinchen wesentlich niedriger als bei der Ratte, obwohl die Unempfindlichkeit der Ratte gegenüber dem P. mit seinem cerebral-toxischen Angriffsort hierdurch keine weitere Stütze erhält.

E. Die klinischen Standardsyndrome der cerebral-zentralen P.-Intoxikation.

Wie wir einleitend ausgeführt haben, bietet die beim Menschen noch wenig studierte Klinik der P.-Intoxikation durch Hervortreten zahlreicher und wechselnder Einzelsymptome eine sehr große Mannigfaltigkeit im Ablauf des Giftbildes, wobei die Zugehörigkeit der Bilder zur P.-Intoxikation oder ihre Abgrenzung gegenüber einer Ausweitung des Grundleidens, das die P.-Medikation erforderlich machte, schwer zu überschauen war.

Aus der Summe der mitgeteilten Einzelsymptome ließen sich mehrere zusammengehörige Symptomkomplexe im Tierversuch herausheben. Wir bezeichnen diese Regelsyndrome als *Standardsyndrome*. Unter ihnen unterscheiden wir das am häufigsten beobachtete Standardsyndrom der *Enteritis* (Enterocolitis) von weiteren Standardsyndromen, dem generalisierten *Krampfbild* und dem *Lungensyndrom*. Bei dem Lungensyndrom

läßt sich das akute diffuse *Lungenödem* von den *Lungenblutungen* abtrennen, wenn auch beide gleichzeitig auftreten können.

Alle diese klinischen Standardsyndrome sind nach unseren Untersuchungen als *periphere Auswirkungen einer primär zentral-cerebralen P.-Vergiftung* aufzufassen.

1. Das Standardsyndrom der Enteritis (Enterocolitis).

Das ausgeprägte Bild der Enteritis zeigte beim Meerschweinchen protoplasmatischen Kollaps mit Flüssigkeitsverarmung des Gewebes als Ausdruck einer Permeabilitätssteigerung der Darmgefäße, Absturz der Körpertemperatur, Gewichtabnahme und Durchfälle. Als sichere Zeichen einer Trans- bzw. Demineralisation fand sich eine erhebliche Reduktion der gesamten Kochsalzausscheidung im Harn, während weitere Mineralstörungen im Blut und Gewebe wohl zu vermuten, jedoch durch unsere Untersuchungen nicht zu belegen waren. Eindickung des Blutes im Zusammenhang mit Abnahme der zirkulierenden Blutmenge zeigte sich im Anstieg der roten Blutkörperchenzahl pro Kubikmillimeter Blut. Die erwartete Oligurie wurde festgestellt und gelegentlich Übergang in beginnende Anurie beobachtet. — Das Bild entsprach durchaus dem der menschlichen akuten Enteritis, z. B. bei dem hochdramatischen Ablauf der Ruhr, der ja nach neuerer Auffassung auch ein Zusammenbruch des Wasser-Mineralhaushaltes bei akuter Permeabilitätssteigerung der Darmwandcapillaren zugrunde liegt. Im Einklang hiermit fanden auch wir terminale hypoglykämische Krampfbilder, wie sie Kronenberg und Mitarb.[26] tierexperimentell nach intravenöser Flexner-Endotoxingabe beobachteten.

Besonders erwähnenswert ist die regelmäßig beobachtete *Latenzzeit* zwischen Injektion und Beginn der Enteritis. Diese Latenzzeit *fehlt beim Krampfsyndrom und den Lungensyndromen*, welche ausgesprochene *Früh-Giftbilder* darstellen, während das Enteritissyndrom, wie bereits erwähnt, durch die Latenzzeit als ausgesprochen spätes Krankheitsbild gekennzeichnet ist. Die Latenzzeit war *unabhängig* von der angewandten P.-Dosis und betrug mindestens 2 Tage, durchschnittlich aber 2—5 Tage, in seltenen Fällen 10—20 Tage. Innerhalb der Latenzzeit war ein abwegiges Befinden der Tiere kaum festzustellen. Zuweilen sah man jedoch jetzt schon Struppigwerden des Haarkleides und geringes Absinken der Körpertemperaturen. Nach Ablauf der Latenzzeit setzte das Standardsyndrom der Enteritis — durchfällige Stühle — ein; manchmal führte schon im Beginn ein akuter Stoffwechsel- und Kreislaufzusammenbruch vor dem eigentlichen klinischen Bilde der Enteritis den Tod herbei. Auch in diesen Fällen wurde dann bei der Sektion das gleiche Bild gefunden wie bei den Tieren nach allmählich sich entwickelnder Enteritis und späterem Eintreten des Todes. Grundsätzlich war also nur eine

quantitative Änderung im Krankheitsablauf des regelmäßig beobachteten Standardsyndroms, und zwar unabhängig von der P.-Dosis bei den verschiedenen Tieren, festzustellen.

Bei 157 Meerschweinchen (s. Tab. 1) bestanden zwischen Enteritisbeginn und dem Zeitpunkt des spontanen Todes folgende Beziehungen:

32 Tiere zeigten vom 3.–4. Versuchstage an Durchfälle und verstarben mehrere Tage (2—5) später bei fortdauerndem Absetzen wäßriger Stühle;

60 Tiere verstarben schon Stunden nach erstem Absetzen wäßriger Stühle;

44 Tiere boten während der ganzen Versuchsdauer bis zum Tode normalen Kot; die Sektion ergab dennoch regelmäßig wäßrigen Inhalt in oberen Darmabschnitten und entzündliche Schwellung der Darmwand;

21 Tiere überlebten; 17 hatten 1—2 Tage lang wäßrigen Kot.

Schon vor dem Auftreten der wäßrigen Stühle trat zunehmend Absinken des *Körpergewichts* in Erscheinung. Der durchschnittliche Gewichtsverlust der Meerschweinchen betrug 19% des Ausgangsgewichtes, mit einer Variationsbreite von 7—42%. — In den letzten Lebensstunden war regelmäßig ein Abfall der *Körpertemperaturen* auf 34—35° zu registrieren (normale Körpertemperaturen 38—39°).

Die anfangs meist schwer gestörte *Freßlust* kehrte mit dem 2.—3. Versuchstage wieder und hielt an bis zum Tode, so daß der Magen bei der Sektion oft mit Speiseresten gefüllt war.

Auch bei den Tieren mit länger anhaltender Enteritis (Durchfälle) erfolgte letzten Endes der tödliche Zusammenbruch plötzlich und war daher termingemäß nicht vorauszusehen.

Die *Sektion* deckte ausnahmslos die Zeichen einer Enterocolitis auf: Der Darm war atonisch gebläht, die Schleimhaut geschwollen, die Darmgefäße zeigten sich strotzend gefüllt, der Darminhalt wies gelb-grünliche, zuweilen blutig gefärbte Flüssigkeit auf mit regelmäßig nachweisbarer Benzidinreaktion und roten Blutkörperchen im Sediment. Im Darminhalt war vor allem die Eiweißprobe positiv (1—3 g%, refraktometrisch bestimmt), während das Albumin-Globulin-Verhältnis des Darmsekretes durchaus dem des Blutserums der Tiere entsprach, woraus also im Zusammenhang mit dem Befund von roten Blutkörperchen eine maximale Permeabilitätssteigerung des Darmcapillarapparates zu erkennen war. Grundsätzlich weisen alle diese Befunde hin auf die von Tonutti u. Matzner 1950 nach P.-Gabe erhobenen feingeweblichen Veränderungen: „Blutumlaufstörungen, massive Exsudation der Darmwand, unter Umständen Nekrose ganzer Zottenkuppen".

Das Gesamtbild des klinischen und pathologisch-anatomischen Geschehens bei der toxischen P.-Enteritis wurde durch *folgende Einzelbefunde* erweitert:

1. Flüssigkeitsverlust der Muskulatur experimentell. Von jedem Tier wurden sofort nach dem Tode Muskelpartien aus Vorder- und Hinterlauf entnommen und gewichtsmäßig bestimmt. Der Wassergehalt der Muskelteile beim P.-Tier und beim normalen Kontrolltier wurde am maximalen Wasserverlust im Brutschrank bei 50° festgestellt. Die Werte nach 48 sowie nach 72 Std waren praktisch identisch und zeigten daher den maximalen Wasserverlust an. Das Gewicht des Rückstandes als reziproker Wert für den Wasserverlust betrug bei den P.-Tieren 27,2 (± 3,5), bei

Tabelle 1. *Latenzzeit, zwischen Injektion und Tod an Krämpfen (1. Tag) und Enteritis (2.—25. Tag) nach verschiedener Penicillindosierung verstreichend.*

Zahl der Meerschweinchen	Applikationsart	E/Tier	E/kg Körpergewicht	1. Tag*	2. Tag**	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8.–12. Tag	13.–25. Tag	Überleben
12	intracerebral	40—50	100—200		2	2				1	5	2	1
6	intracerebral	100	300—400	3			2	1					
20	intracarotical	500—2000	1200—1000		2	9	6	2			1		2
3	intramuskulär	3000	10000										3
5	intramuskulär	6500	20000										5
4	intramuskulär	10000	25000—30000					1		1			2
95	intramuskulär	35000—45000	80000—130000		6	20	40	14	3	1	2		9
3	intramuskulär	65000	140000					1	1		1		
9	intracarotical	200000	600000—800000	2	2	3			2				
8	intracarotical	300000	1 Mill.	3			1	1	2	1			
3	intramuskulär	2 Mill.	6—8 Mill.				2		1				
4	intrakardial	3—4 Mill.	800000—1,2 Mill.	1		1	2						
172				9	12	35	53	20	9	4	9	2	22

* Tod in der 1.—6. Std. ** Tod in der 42.—48. Std.

12 Kontrolltieren 21,5 (+ 1,5%). Das Gewicht der Muskulatur des P.-Tieres nahm also im Brutschrank wesentlich weniger durch entsprechenden Gewebswasserverlust ab, als das des Normaltieres. Dies im Einklang mit dem allgemeinen Gewebswasserverlust beim P.-Tier.

2. *Bluteindickung* am Verlauf der *Erythrocytenwerte* vor P.-Injektion und am Ende des Krankheitsbildes.

Bei 12 Tieren mit 100000 E/kg intramuskulärer Injektion wurden fortlaufend 2mal täglich Erythocytenzählungen vorgenommen: Bis kurz vor dem tödlichen Ende hielten sich die Werte innerhalb normaler Grenzen zwischen 4,6—5,3 Mill./mm³, stiegen dann unmittelbar vor dem Tode sprungartig an bis zu Werten von 9,2 Mill./mm³, im Durchschnitt bei 32 Tieren auf 7,1 Mill./mm³.

3. Die *terminalen hypoglykämischen Krampfbilder* generalisierter Art wurden bei 21 von 28 Tieren bei Blutzuckerwerten unter 30 mg% beobachtet (normaler Blutzuckerwert 90—150 mg%). Im Einzelnen:

11 Tiere zeigten Blutzuckerwerte zwischen 90—150 mg%,
12 Tiere zeigten Blutzuckerwerte zwischen 50— 85 mg%,
8 Tiere zeigten Blutzuckerwerte zwischen 30— 50 mg%,
28 Tiere zeigten Blutzuckerwerte zwischen 9— 30 mg%.

Nur bei der letzten Gruppe traten Krampfbilder auf, die also eindeutig als hypoglykämische von den initialen Krampfbildern der zentralen P.-Intoxikation mit durchwegs hyperglykämischen Werten (Blutzucker bis 450 mg%) abzutrennen waren. Der Befund normaler Leberglykogenwerte bei den Tieren mit hypoglykämischen Krampfbildern unterstreicht den Zusammenbruch der peripheren Regulationen (Unfähigkeit des Leberglykogenabbaues bzw. Aufhebung der normalen Beziehungen zwischen intra- und extracellulärem Stoffwechsel) im Zustand des Kollapsgeschehens.

4. Der *Cholesterinspiegel* sank von den Normalwerten (um 60—100 mg%) auf Werte von 18—50 mg% terminal ab, wohl auch als Zeichen des Gesamtstoffwechselzusammenbruches.

5. *Mineralstoffwechsel.* Weniger der prozentuale Kochsalzanteil als die Gesamtkochsalzausscheidung im Harn war stark herabgesetzt. Die Verfolgung einer sekundären Tubulistörung am Anstieg der Blutstickstoffwerte war aus technischen Gründen nicht möglich.

Die Werte für Calcium mit 12 –14 mg%, die für Kalium mit 20 –24 mg% im Blute, auch im Endzustand, gaben natürlich während des protoplasmatischen Kollapses keinen Eindruck von den eigentlichen Mineralstörungen des Gewebes. Der Versuch, am Verhalten des Ekg bei gleichzeitiger Herztonschreibung, eine Kaliumstörung nachzuweisen, mißlang; das Ekg von 30 fortlaufend untersuchten Tieren zeigte in dieser Hinsicht keine Änderungen. Jedoch fehlen unseres Wissens Angaben im Schrifttum, ob man die Beobachtungen beim Menschen sowie bei verschiedenen Versuchstieren auch auf das Meerschweinchen übertragen kann.

6. *Herzrhythmusstörungen* wurden bei 5 Tieren entweder in Form von Extrasystolien oder von Vorhofflimmern festgestellt. Eine besondere Deutung erübrigt sich.

7. Die Frage der Mitwirkung einer akuten *Nebennierenrindeninsuffizienz* bei der P.-Intoxikation von Meerschweinchen ist bereits im Schrifttum (Miescher u. Böhm[27], Tonutti[46]) studiert worden. Die nur einige Male beobachteten Nebennierenblutungen nach P.[27] wurden von Nachuntersuchern[46] vermißt, so daß die Einwirkung von giftigen Ballaststoffen bei dem P. der Jahre 46/47 ursächlich beteiligt sein könnte. Gegen die Auffassung einer Nebenniereninsuffizienz als entscheidende Mitwirkung bei der Intoxikation sprechen bisher nicht veröffentlichte Untersuchungen von Tonutti[45], wonach fortlaufende Cortisongabe beim

P.-Tier das Krankheitsbild nicht änderte, während das feingewebliche Bild dem der *progressiven* Transformation der Nebennierenrinde nach Tonutti[46] als Zeichen akuter Funktionssteigerung entsprach.

Während also beim *Meerschweinchen* eine *P.-Enteritis* derart regelmäßig anzutreffen war, daß ihr Auftreten geradezu als *Standardsyndrom* des P.-Giftbildes darzustellen war, haben unsere Versuche zur Erzeugung einer P.-Enteritis bei der *Ratte* zu *keinem positiven* Ergebnis geführt.

Wir sahen bei Ratten, denen wir *intramuskulär* sehr hohe P.-Mengen (bis zu 6 Mill. E kg) zuführten, nicht die geringsten Krankheitserscheinungen. Auch die Enteritis blieb völlig aus. Das histologische Bild der Organe von Ratten, die mit solch hohen P.-Dosen beschickt worden waren, hat Tonutti[45] studiert. Er konnte, entsprechend unserem klinischen Befunde, keine Organveränderungen, vor allem auch keine Darmschädigung, feststellen. Auch die beim Meerschweinchen so charakteristische Umwandlung der Struktur der Nebennierenrinde nach P.-Gabe (progressive Transformation nach Tonutti) wurde bei Ratten vermißt. — Eine Stressorwirkung des P. im Sinne von Seyle mit dem Effekt der Auslösung des Adaptationssyndroms bestand also *nur* für das *Meerschweinchen, nicht* für die *Ratte*.

Bei Einverleibung des P. *direkt ins Rattenhirn* aber sahen Tonutti u. Matzner gelegentlich Blutumlaufstörungen und Zottennekrosen der Darmwand. Bei dem gleichzeitig vorhandenen Krampfsyndrom betrug die Überlebenszeit dieser Tiere nur 1—2 Std, so daß die Darmveränderungen sich in dieser kurzen Zeit entwickelt hatten.

Bei 12 Ratten jedoch, die das akute Krampfsyndrom überstanden, sahen wir im weiteren und monatelang beobachteten Verlauf *klinisch nie die Zeichen einer Enteritis*. Selbst nach serienmäßig hintereinander in halbstündigen Abständen folgenden P.-Injektionen, sei es direkt ins Cerebrum oder aber in die Carotis, erholten sich 6 weitere Ratten nach Überwindung oft mehrfacher Krampfanfälle vollständig. Sie nahmen danach an Gewicht zu und zeigten auch später niemals die Zeichen einer Enteritis.

Die Deutung der ausgefallenen Befunde von Tonutti u. Matzner[48] muß mit der übersteigerten P.-Dosis im Gehirn bei örtlicher intracerebraler Applikationsweise gegenüber der örtlich dann nicht mehr ausreichenden Konzentration an Penicillinaseaktivität in Zusammenhang gebracht werden. Dennoch bewirkt dieser spezifische Gegenspieler des P. eine unmittelbare Dämpfung des toxischen Effektes, so daß zwar ein transitorisches Giftbild, von dem die Tiere sich restlos erholten, jedoch niemals letale Ausgänge infolge Enteritis beobachtet wurden.

2. Krampfsyndrom.

Durch intracerebrale P.-Verabreichung von mindestens 350 E/kg beim Meerschweinchen, 600 E/kg bei der Ratte erzeugten Tonutti u. Matzner[48] ein „tollwutähnliches" Krankheitsbild.

Wir wiederholten diese Versuche an je 10 Meerschweinchen und Ratten. Die zentralerregende Krampfwirkung des P. setzte meist *sofort* und ohne Latenzzeit ein, was keinesfalls selbstverständlich ist, wie sich aus Vergleichen mit Diphtherie-Toxin ergibt. Injiziert man nämlich

beim Meerschweinchen an Stelle des P. 1—3 dm. *Diphtherie-Toxin*, also eines der schwersten Bakteriengifte, das wir kennen, so bleiben unmittelbar an die intracerebrale Einverleibung alle Krankheitserscheinungen aus. Erst nach 10—20 Std erkrankt das Tier zunehmend an sogenannter „cerebraler Diphtherie" und geht erst später daran zugrunde (Tonutti[45–48]).

Im Bilde der zentralerregenden Krampfwirkung des P. ergaben sich auch bei gleicher Dosierung gewisse Unterschiede, offenbar abhängig von der Örtlichkeit der mit P. beschickten Hirnpartie. Zielgerechte Injektionen sind ja bei Meerschweinchen und Ratten nicht einfach auszuführen. Zielgeräte zur genauen örtlichen Hinlenkung intracerebraler Eingriffe wurden bislang nur für größere Versuchstiere (z. B. Katzen), nicht aber für kleinere Laboratoriumstiere entwickelt.

Im einzelnen wiederholte sich nach Injektion das Bewegungsbild in gleicher oder doch ähnlicher Weise. Bei Injektion in die rechte Hirnhälfte trat eine Laufrichtung im Kreise nach rechts auf, während bei linksseitiger Injektion die Laufrichtung umgekehrt war. Später änderte sich gelegentlich die Laufrichtung nach der Gegenseite, wie wir glauben im Zusammenhang mit der inzwischen eingetretenen unmittelbaren Kontaktdiffusion des P. in die andere Hirnhälfte, vielleicht auch über den Liquor, wie dies früher bei Katzen und Hunden von anderen Autoren[9] beschrieben wurde. Andere Tiere zeigten pausenlose, zuweilen stundenlang anhaltende Rollkrämpfe, wiederum nach der Injektionsseite hin. Dann konnte man bei den Ratten Hochsprünge bis 30 cm und Weitsprünge bis 50 cm beobachten. Bei Rückenlage setzten oft blitzartige sinnlose Laufbewegungen ein. Anfälle von Opisthotonus durch Rückenmuskelkrämpfe gingen oft über in krampfhafte Einrollung nach der Bauchseite hin. Durch tonische Krämpfe der gesamten Skeletmuskulatur wurden verschiedenartige Körperstellungen eine Zeitlang, oft stundenlang fixiert gehalten (Sitzhaltung oder Strecklage). Dann konnte man öfter auf Entfernung hin Zähneknirschen oder „Unterkieferschnattern" (Masseterkrämpfe) hören. Es wurden aber auch nicht so bestimmt charakterisierte Bewegungen gesehen. Unter anderem traten heftige, oft stundenlang anhaltende tonisch-klonische Krämpfe auf. Der geschilderte verschiedenartige Bewegungskrampf wurde immer wieder von Pausen abgelöst, in denen die Tiere zwar wie normal aussahen, aber gegenüber taktischen, akustischen und optischen Reizen überempfindlich und aufschreckbar waren.

Auch *vegetative Reizbilder*, wie Hecheln, Schreien, Ächzen, Leck- und Kratzeffekte, Speicheln, Tränenfluß, gehäufter Kot- und Urinabgang, aber auch eigenartiger Atemtypus wie Schnappatmung, große und schnelle Atmung boten sich im Rahmen des zentralen Erregungsbildes zu bestimmten Zeiten dar.

Bei stärker reduzierten Dosen von 200—300 E/kg intracerebral beim Meerschweinchen und 400—500 E/kg bei der Ratte traten nur leichtere Krampfbilder oder vegetative Erregungsbilder in Erscheinung, während dabei die großen Anfälle nach Art von Tollwut mit Laufbewegungen, Rollkrämpfen, ausblieben.

Auf Grund der später geschilderten klinischen Bilder bei der menschlichen P.-Intoxikation lag es nahe, die Wirkung extracerebral (intraarteriell, intravenös oder intramuskulär) zugeführten P. hinsichtlich des Krampfsyndroms zu untersuchen.

Die muskulären und vegetativen Erregungsbilder spielten sich bei der *extracerebralen P.-Einverleibung* folgendermaßen ab: Während intramuskuläre Injektion bis zu 8 Mill. E/kg bei Ratten und Meerschweinchen erfolglos blieb, sah man bei *intrakardialer* Injektion von 800000

bis 2 Mill. E/kg bei 1 Meerschweinchen ein tödlich ausgehendes, generalisiertes Krampfbild, bei 2 Meerschweinchen leichtere, schnell überwundene Krämpfe, während 1 Tier überhaupt kein zentrales Erregungsbild bot. Bei Injektion in die *Carotis* gelang die Krampfauslösung sowohl bei Ratten als auch bei Meerschweinchen regelmäßig, wobei sich nicht nur eine Abhängigkeit von der Dosierung, sondern auch eine von der Konzentration zeigte, wie dies in Tab. 2 wiedergegeben ist. Im ganzen stimmte unsere Annahme, wonach es auch hier wieder einerseits auf die Konzentration des das Gehirn erreichenden P.'s, andererseits auf die etwaige Anwesenheit eines spezifischen P.-Gegengifts (Penicillinaseaktivität) ankommt. Bei relativ kleinen Dosen sah man beim Meerschweinchen häufig, bei der Ratte (Penicillinaseaktivität!) niemals Krampfauslösung, während bei hoher Konzentration des P.'s die örtlich vorhandene Penicillinaseaktivität im Gehirn überstimmt wird und so bei der Ratte

Tabelle 2. *Versuche mit Penicillininjektion in die Carotis. Unterschiedliches Verhalten der Ratten gegenüber den Meerschweinchen bei Wechsel von P.-Dosis und P.-Konzentration.*

Dosis in E/kg	P-Konzentration	Versuch bei Meerschweinchen					Versuch bei Ratten		
		Zahl	Krampfbild	Chron. Lungenblutung	tödlich ausgehendes Enteritisbild	Zahl	Krampfbild	Chron. Lungenblutung	Enteritis
2000—10000	1000 E/0,5 bis 1 cm³ NaCl	20	3 leicht	2	18	3	∅	∅	∅
100000—400000	100000 E/0,4 bis 1 cm³ NaCl	2	2 leicht	1	2	2	∅	∅	∅
500000—800000	10000 E/0,4 bis 1 cm³ NaCl	6	6 stärk. Krämpfe 1 †	2	5	3	∅	∅	∅
800000 bis 1600000	100000 E/0,4 bis 1 cm³ NaCl	8	8 stark. Krämpfe 3 †	3	5	6	5 deutliches Krampfbild, 2 †	∅	∅
200000—400000	100000 E/0,1 bis 0,2 cm³ NaCl	—	—	—	—	3	3 ganz leichte Krämpfe	∅	∅
600000—800000	100000 E/0,1 bis 0,2 cm³ NaCl	3	3 schweres Krampfbild, 1 †	1	2	5	5 sofortiger Tod in Apnoe		

unter Umständen sogar eine besondere Überempfindlichkeit bestimmter cerebraler Reizorte zum Vorschein kommt. So sahen wir z. B. bei massiver P.-Gabe nur bei Ratten (nicht bei Meerschweinchen) sofortigen Atemstillstand mit Todesfolge eintreten.

3. Lungensyndrom.

a) *Lungenödem.* Fast alle Ratten und Meerschweinchen boten während des akuten Krampfsyndroms die deutlichen Zeichen eines akuten diffusen Lungenödems. Die Atmung war rasselnd und meterweit hörbar, es zeigte sich rötlicher Schaum vor dem Munde.

b) *Lungenblutungen.* Die Sektion ergab regelmäßig eine erhebliche Vermehrung des Flüssigkeitsgehalts der Lungen und reichlich punktförmige bis konfluierende, mitunter einen ganzen Lappen einnehmende Lungenblutungen. Auch Tiere, die wenige Minuten nach intracerebraler P.-Injektion starben, bzw. die schnell getötet wurden, boten die gleichen ausgedehnten Veränderungen (Bestätigung der Befunde Tonuttis[45–48]).

Zweifellos war das nach der Injektion sofortige Auftreten des massiven Lungenödems und der Lungenblutungen nicht mit dem mechanischen Vorgang der Injektion an sich zu erklären. Injektion gleicher Menge physiologischer Kochsalzlösung z. B. zeigten nie einen Erfolg. Vielmehr handelte es sich eindeutig um die Folgen der cerebral ausgelösten P.-Giftwirkung. Erwartungsgemäß fanden wir daher regelmäßig das gleiche akute Krankheitsbild nach intracaroticaler P.-Injektion, wenn eine entsprechend große Dosis angewandt wurde.

Auch für die Entstehung des akuten Lungenödems beim Menschen wird ja heute ein vornehmlicher cerebraler Einfluß angenommen, z. B. bei der Mitralstenose oder nach Hirntraumen, wie das Wanke[52] z. B. für letztere annehmen und tierexperimentell bestätigen konnte. — Es bestehen also auch für das cerebral bedingte toxische Lungenödem und die Lungenblutungen mit Hinblick auf das akute Lungenödem beim Menschen dieselben Beziehungen, wie wir sie vorher bei der toxischen P.-Enteritis analog etwa der Dysenterie beim Menschen aufgezeigt haben, die ja nach neueren Feststellungen[25, 26] vermutlich auch eine allgemeine Capillarreaktion (infolge eines neurotoxischen Effektes des Flexner-Endotoxin?) als Ursache hat.

Lungenödem und Lungenblutungen waren nicht immer koordinierte Krankheitszeichen. Sie zeigten vielmehr eindeutige Abhängigkeit von der cerebral angreifenden P.-Giftdosis. Gab man intracerebral kleine P.-Mengen (100—200 E/kg), so trat auch beim Meerschweinchen kein akutes Lungenödem auf, und wenn die Tiere Tage später an Enteritis verstarben, so fand man verstreut umschriebene Blutungsherde in den Lungen. Letztere sind also mit kleineren Dosen hervorzurufen, als sie für das Zustandekommen des akuten Lungenödems erforderlich waren. Bei großen intracerebralen Dosen traten, wie schon gesagt, beim Meerschweinchen wie bei der Ratte Lungenödem und Lungenblutungen gleichzeitig auf und führten schnell zum Tode. Die kleinen Dosen von 150—200 E/kg wirkten dagegen bei der Ratte anscheinend überhaupt nicht: Lungenödem war nicht zu erkennen, und die Tiere starben später auch nicht an Enteritis. Selbst mehrfache intracerebrale P.-Gaben, die Krämpfe auszulösen vermochten, führten bei der Ratte nach Überstehen des akuten Lungenödems später nie zu chronischen Lungenblutungen. Die Ursache der geringen Giftempfindlichkeit der Ratte ist wiederum in der von uns nachgewiesenen Penicillinaseaktivität des Rattenhirngewebes zu suchen.

Die *Abhängigkeit von der Dosierung* zeigte sich auch bei nicht cerebraler, sondern intracaroticaler Einverleibung des P. Hierbei mußten natürlich wesentlich größere Dosen zur Anwendung kommen. Beim Meerschweinchen riefen intracaroticale Gaben von 1200–2500 E/kg noch kein Lungenödem, dagegen nicht selten langdauernde Lungenblutungen hervor. Diese kleinen Dosen bewirkten bei der Ratte überhaupt nichts (Penicillinaseaktivität!), ganz große Dosen von etwa 1 Mill. in die Carotis erzeugten bei beiden Tierarten, Meerschweinchen und Ratten, regelmäßig Lungenödem und Lungenblutungen. Bei intramuskulärer Verabreichung erzielte man selbst mit großen Dosen von 8 Mill. E/kg noch kein Lungenödem, weil bei intramuskulärer Gabe eine zu geringe P.-Anreicherung im Gehirn erreicht wird. Dagegen zeigten 2 Meerschweinchen, die aus anderen Gründen nach 4 Std getötet und untersucht wurden, umschriebene Lungenblutungen.

Daraus geht hervor, daß schon bei niedrigerer P.-Hirn-Konzentration es zu Lungenblutungen allein, bei höheren P.-Konzentrationen im Hirn außerdem auch zu Lungenödem kommen kann.

III. Ergebnisse.

1. Als Ausdruck der am kranken Menschen sowie der experimentellen am Tier beobachteten P.-Vergiftung sieht man regelmäßig einheitliche Krankheitsbilder, die wir als sogenannte „*Standardsyndrome*“ *der P.-Intoxikation* angesprochen haben.

Es sind dies a) das allgemeine *Krampfsyndrom*, manchmal mit Übergang in vorübergehendes tollwutähnliches Bewegungsbild, b) ein akut auftretendes diffuses *Lungenödem* mit *Lungenblutungen*, c) das Bild der sogenannten *Enteritis*.

2. Nachdem von Tonutti u. Mitarb.[45–48] der Nachweis geführt werden konnte, daß den Standardsyndromen Enteritis und Lungenödem ein akutes Versagen des Capillarapparates der betreffenden Organe zugrunde liegt, konnten wir in vorstehenden Experimentaluntersuchungen aufdecken, daß diese organbezogene „Capillartoxikose“ zentral-cerebral in Gang gesetzt wird. — Auf welche Weise und auf welchem Wege der zentral-cerebrale Gifteffekt das Versagen der Capillarperipherie auslöst, ist uns noch unbekannt.

3. Der zentral-cerebral-toxische Angriffspunkt des P. ließ sich dadurch sichern, daß nur dann im Tierexperiment die toxischen Standardsyndrome auftraten, wenn sich P. im Hirn der Tiere nachweisen ließ. Bei diesem Zusammenhang mußte von vornherein eine Abhängigkeit des zu erwartenden Gifteffektes von der Applikationsweise vermutet werden. Sie wurde tatsächlich von uns nachgewiesen, indem sich zeigte, daß bei Vergleichsbeobachtungen zwischen intramuskulärer, intrakardialer, intracaroticaler Darreichung die Standardsyndrome bei der intracaroticalen Verabreichung mit der kleinsten P.-Dosis sich erzielen ließen. Auch Versuche an großen Tieren sowie Beobachtungen am kranken Menschen bestätigten unsere Vermutung, daß es allein auf jene in der Hirnsubstanz anlangende P.-Menge ankommt.

4. Entsprechend dem von uns nachgewiesenen zentral-cerebralen Angriffspunkt der Giftwirkung müßte an sich bei allen Tierarten wie auch beim Menschen mit einer gleichen Giftempfindlichkeit des Gehirns gegenüber dem P. gerechnet werden.

Im Gegensatz zu dieser Annahme steht die Beobachtung, daß das *Meerschweinchen gegenüber P.-Gaben hochempfindlich, die Ratte dagegen P.-unempfindlich ist.* Diese Diskrepanz im Verhalten der beiden Tierarten gegenüber der toxischen P.-Wirkung veranlaßte uns, nach besonderen entgiftenden Eigenschaften des Rattenhirns zu fahnden. Daraufhin gerichtete Untersuchungen haben die Bestätigung dieser Vermutung ergeben, indem sich *nur bei der gegenüber P. unempfindlichen Ratte, nicht beim Meerschweinchen,* im Hirngewebe ein wirksamer P.-Zerstörungsfaktor, eine *Penicillinaseaktivität,* auffinden ließ.

Nur in Ausnahmefällen kann auch bei der Ratte ein P.-Gifteffekt auftreten, wenn der Wirkungsgrad der Penicillinaseaktivität des Gehirns durch übersteigerte P.-Konzentration im Gehirn überstimmt wird. Hierbei spielt selbstverständlich die Art der Applikationsweise eine ausschlaggebende Rolle, indem z. B. eine örtliche cerebrale P.-Injektion schon bei relativ kleiner Dosis die Giftwirkung in Erscheinung treten lassen kann.

Im Laufe unserer angeführten Versuchsserien ergab sich die Notwendigkeit, *noch weitere Schutzmechanismen* des Gehirns gegenüber einer P.-Intoxikation anzunehmen. In Betracht kam ein Schutzfaktor seitens der Blut-Hirnschranke, der Blut-Liquorschranke sowie der Liquor-Hirnschranke.

Schon aus den in der Einleitung mitgeteilten Beobachtungen an Mensch und Tier konnte der Liquor-Hirnschranke keine Bedeutung zukommen. Denn bei relativ kleinen intrathekal gegebenen P.-Dosen waren z. B. bei gesunden Menschen mehr oder weniger schwere toxische Krankheitssymptome zu beobachten.

Als *wichtig* müssen wir dagegen die Schutzwirkung der *Blut-Hirnschranke* ansprechen. Sie ließ sich eindeutig nur am P.-empfindlichen Meerschweinchen, dem ja die schützende Penicillinaseaktivität im Hirn fehlt, auf Grund vergleichender Blut- und Hirn-P.-Spiegel-Untersuchungen nach dosierter intramuskulärer oder intracaroticaler Gabe studieren. Bei den Versuchen ließ sich der Schutzeffekt der Blut-Hirnschranke bei geeigneter Dosierung an dem sehr niedrigen oder überhaupt nicht nachweisbaren P.-Spiegel im entbluteten Hirn gegenüber dem gleichzeitig vorhandenen hohen P.-Blutspiegel demonstrieren. Mit der Annahme einer guten Schutzwirkung der Blut-Hirnschranke stimmen auch unsere Untersuchungsergebnisse überein, die zeigten, daß eine noch so gewaltige Übersteigerung der intramuskulären P.-Dosis (8 Mill. E/kg) beim Meerschweinchen nicht imstande war, eine zur Auslösung des

Krampfsyndroms notwendige P.-Konzentration im Gehirn zu erzielen. Bei diesen höchsten intramuskulären P.-Gaben muß also eine wirksame Abschirmung des Konzentrationsgefälles vom Blut zum Gehirn hin erfolgt sein.

Die Prüfung eines etwa vorhandenen Schutzmechanismus der *Blut-Liquorschranke* konnte von früheren Autoren[8, 33, 34] und von uns am Menschen mit gleichem Ergebnis durchgeführt werden. Bei sehr hohen intramuskulären P.-Mengen von je 20 Mill. E wurde ein entsprechend hoher P.-Blutspiegel, dagegen nur ein niedriger P.-Liquorspiegel festgestellt. Daß bei einer solchen P.-Überschwemmung des Körpers beim Menschen keine toxischen Standardsyndrome der P.-Vergiftung beobachtet wurden, ist auf eine gemeinsame Schutzwirkung der Blut-Hirn- und Blut-Liquorschranke zurückzuführen, wobei die beim Versuchstier aufgefundene Schutzwirkung der Blut-Hirnschranke vielleicht mit Vorbehalt auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen werden können. Der wichtigste Schutzeffekt ist jedoch zweifellos in der Penicillinaseaktivität des Gehirns bei den P.-unempfindlichen Tieren und vermutlich auch beim Menschen, zu suchen.

5. *Beobachtungen am kranken Menschen* lassen darauf schließen, daß bei bestimmten Krankheiten die beschriebenen Schutzmechanismen und vielleicht auch die Wirkungsgrade der Penicillinaseaktivität verändert sein können.

Wiederholte Beobachtungen über schwere P.-Vergiftungsbilder (sowohl Auftreten von hochtoxischen generalisierten Krampfsyndromen[38, 49] als auch von Enteritis-Syndromen[29, 31] sogar bei intramuskulärer Verabreichung relativ bescheidener Dosen bei Kranken mit *Lues cerebri*) lassen auf eine Durchbrechung der genannten Sicherungsmechanismen gegenüber der Hirn-P.-Vergiftung schließen. Da auf Grund unserer Untersuchungen am Meerschweinchen, bei dem intramuskuläre P.-Gabe beliebiger Größenordnung wegen der fehlenden Penicillinaseaktivität des Gehirns höchstens das Enteritis-Syndrom als spätes Vergiftungsbild auslöste, dagegen niemals das Krampfsyndrom, müssen wir bei den Lues cerebri-Kranken im Falle des Auftretens des *Enteritis- und Krampf*-Syndroms auf eine Schädigung der Wirkung der Penicillinaseaktivität des Gehirns *und* der Blut-Hirnschrankenfunktion schließen.

Ein anderes Beispiel dieser Art sind unsere eigenen 3 Krankenbeobachtungen mit tödlich endender P.-Vergiftung bei einer akuten Sepsis in einem Falle, bei einer schweren Pneumonie im 2., und bei einer schon in Remission befindlichen Agranulocytose im 3. Fall. Relativ niedrige intramuskuläre P.-Dosen waren verabreicht worden. Bei allen 3 Patienten war das typische schwere generalisierte Krampfsyndrom und pathologisch-anatomisch das erwartete Bild des Hirnödems vorhanden[4, 12, 22, 50].

Besonders eindrucksvoll sind die Beobachtungen von Bateman u. Mitarb.[1], die große intravenöse P.-Dosen (je 12 Mill. E in 4stündlichen Abständen) mit dem Ziele der Tumorwachstumshemmung bei Tumorkranken verabreichten und schwere Krampfbilder mit zweimal tödlichem Ausgang erlebt haben. Die genannten Autoren haben den Zusammenhang mit der eingetretenen P.-Hirn-Vergiftung nicht erkannt,

wie das bei analogen Schrifttumsbeobachtungen durchwegs der Fall ist[38, 49, 50]. Wegen Erhöhung der Reststickstoffwerte im Blute haben sie den tödlichen Ausgang mit dem Bilde des Krampfsyndroms als Urämiefolge aufgefaßt.

Diese wenigen Beobachtungen beweisen die große Bedeutung einer bei verschiedenen Krankheiten möglichen P.-Intoxikation. Es ergibt sich daraus die Forderung, häufiger nach P.-Zwischenfällen im Laufe der Behandlung zu fahnden. Es liegt auf der Hand anzunehmen, daß derartige Zwischenfälle öfter als bisher bekannt geworden auftreten, und daß die dabei beobachteten klinischen Bilder bei der bisherigen Unkenntnis irrigerweise in den Ablauf des Grundleidens einbezogen werden. Die vorstehende Charakterisierung der verschiedenen klinischen Standardsyndrome als Folge einer P.-Intoxikation wird es nunmehr möglich machen, manche bisher nicht erkannte toxische P.-Zwischenfälle und das tatsächliche Ausmaß der P.-Schäden am kranken Menschen zutreffender zu beurteilen.

Literatur.

[1] Bateman, J. C., J. R. Barberio, P. Grive, C. T. Klopp and H. Pierpont: Arch. int. Med. **90**, 6, 763 (1952). — [2] Bayley, P.: Ann. Surg. **122**, 917 (1945). — [3] Becker, A.: Z. Laryng. usw. **29**, 25 (1950). — [4] Beickert, P., u. Noetzel: Klin. Wschr. **1952**, 37. — [5] Blaich, W.: Arch. f. Dermat. **188**, 676 (1950). — [6] Blaich, W., u. U. Gerlach: Ärztl. Wschr. **1950**, 385. — [7] Blaich, W., u. D. Tüshaus: Arch. f. Dermat. **188**, 683 (1950). — [8] Boger, W. P., and W. W. Wilson: Amer. J. Med. Sci. **217**, 593 (1949). — [9] Borkowski, W. J., and F. M. Forster: J. Neuropath., Baltimore **6**, 201 (1947). — [10] Broadbent, R., G. L. Odom and B. Woodhall: J. Amer. Med. Assoc. **140**, 1008 (1949). — [11] Burleson, R. J.: J. Amer. Med. Assoc. **142**, 562 (1950). — [12] Cohen, M. M.: J. Neuropath., Baltimore **11**, 335 (1952). — [13] Drysdale: Brit. Med. J. **4467**, 223 (1946). — [14] Erikson, T. C., M. G. Mastern and H. M. Snekle: J. Amer. Med. Assoc. **132**, 561 (1946). — [15] Felder, S. L., and L. Felder: J. Amer. Med. Assoc. **143**, 361 (1950). — [16] Fleming, A., and Smith: Lancet **207**, II (1947). — [17] Fromols: Demeilly Lille (1947). — [18] Gasser, C., E. Rossi u. H. Pichler: Helvet. Paed. Acta **1**, 165 (1945). — [19] Gasser, C., E. Rossi u. H. Pichler: Helvet. Paed. Acta **2**, 405 (1947). — [20] Hagueman et Bougues: Bull Soc. méd. Hôp. Paris **63**, 186 (1947). — [21] Hamre, D. M., G. Rake, C. M. McMee and Mc Phillamy: Amer. J. Med. Sci. **206**, 642 (1943). — [22] Hoen, E.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 204. — [23] Irrgang, K., u. U. Dörnbrack: Z. inn. Med., Leipzig **3**, 455 (1948). — [24] Johnson, H. C., and A. E. Walker: J. Amer. Med. Assoc. **127**, 217 (1945); **123**, 330 (1943). — [25] Kroneberg, G., u. E. Pötsch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 213 (1952). — [26] Kroneberg, G., u. W. Sandritter: Klin. Wschr. **1952**, 423. — [27] Miescher, G., u. C. Böhm: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 821. — [28] Miller, M. D., and N. C. Durham: J. Pediatr. **28**, 671 (1946). — [29] Nikolowski, W.: Dtsch. med. Rdsch. **1948**, 6. — [30] Oberschulte, K.: Inauguraldiss. Freiburg/Breisgau 1950. — [31] Peters, A., and L. Barton: Amer. J. Syph. **31**, 522 (1947). — [32] Pichler, Meacham and Smith: J. Amer. Med. Assoc. **123**, 330 (1943). — [33] Rammelkamp, C. H., and C. S. Keefer: Amer. J. Med. Sci. **205**, 342 (1943). — [34] Redfearn, J. W. T., A. Elithorn, K. Zill and F. A. Ibbott: Lancet **1949** II, 652. — [35] Reuling and Cramer: J. Amer. Med. Assoc. **134**, 16 (1947). — [36] Rotter u. Wagner: Zbl. Path. **89**, 137 (1952). — [37] Sawicky, H. H., u. Ch. R. Rein: Arch. f. Dermat. **58**, 83 (1948). — [38] Scott, Maxwell and Skinner: J. Amer. Med. Assoc. **139**, 217 (1949). — [39] de Sèze, S.,

u. Mitarb.: Bull. Soc. méd. Hôp. Paris **63**, 949 (1947). — [40] Siegal, S.: J. Amer. Med. Assoc. **129**, 547 (1945). — [41] Spatz, H.: Arch. f. Psychiatr. **101**, 267 (1934). — [42] Sperber, G.: Z. Laryng. usw. **28**, 1 (1949). — [43] Stuart, P., and L. Slavin: Nature (Lond.) **167**, 319 (1951). — [44] Sweet, L. K., E. Dumoff-Stanley, H. F. Dowling and M. H. Lepper: J. Amer. Med. Assoc. **127**, 263 (1945). — [45] Tonutti, E.: Persönliche Mitteilungen. — [46] Tonutti, E.: „Über die Enteritis des Meerschweinchen nach Penicillinverabreichung und ihren Entstehungsmechanismus", i. Druck in Acta Neuroveg. — [47] Tonutti, E.: Zbl. Neur. **112**, 137 (1950). — [48] Tonutti, E., u. K. H. Matzner: Klin. Wschr. **1950**, 516. — [49] Traina, I.: Il Lattaute, Parma **22**, 34 (1951). — [50] Waldbott, G.: J. Amer. Med. Assoc. **139**, 526 (1949). — [51] Walker, A. H., H. C. Johnson and I. I. Kottlors: Surg. etc. **81**, 692 (1945). — [52] Wanke, R.: Pathologische Physiologie der frischen geschlossenen Hirnverletzung, insbesondere der Hirnerschütterung. Stuttgart: Georg Thieme 1948. — [53] Wawersik, F.: Med. Klin. **1946**, 510. — [54] Wilson, G., C. Rupp and U. W. Wilson: J. Amer. Med. Assoc. **140**, 1076 (1949).

Prof. Dr. H. Bohn, Mediz.- u. Nervenklinik der Justus Liebig-Hochschule, Gießen.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 184—192 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle).

Über die Wirkung ganglienblockierender Stoffe auf die Gallenentleerung unter besonderer Berücksichtigung von Magnesiumsulfat.

Von
W.-D. Erdmann und H. F. Henne.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. März 1953.)

Der Mechanismus der physiologischen Gallenentleerung in den Dünndarm beruht letztlich auf dem geordneten vegetativen Zusammenspiel der Motilität von Gallenblase, Sphincter Oddi und Duodenum. Innerhalb dieses in der Regel funktionell koordinierten Systems spielt der Sphincter Oddi zweifellos eine bedeutsame Rolle, da er 1. auch nach Exstirpation der Gallenblase (Einhorn, Mendenhall) und 2. auch unabhängig von der Tonuslage des Duodenums (Erdmann u. Henne) den Gallenfluß zu steuern vermag.

Auch neuere klinische Erfahrungen (Geissendörfer; Herrmann; Lester u. Colp) haben gezeigt, daß dieser Schließmuskel größere Beachtung verdient. So können Spasmen des Sphincter Oddi offenbar zu schweren Gallenkoliken führen (Schüpbach). In früher mitgeteilten Untersuchungen (Henne u. Erdmann, Erdmann u. Henne) haben wir im Experiment am narkotisierten Tier durch Prostigminisierung derartige Sphincterspasmen nachzuahmen versucht und geprüft, welche Stoffe sich eignen, den Schließmuskelkrampf zu beseitigen.

Es liegt nahe, für den rhythmischen Tonuswechsel des Sphincter Oddi ein nervös-übergeordnetes, verantwortliches Schaltzentrum anzunehmen, das gleichzeitig auch die sinnvolle Innervation der Gallenblase und möglicherweise der Darmwand (zumal im Sphinctergebiet) steuert. Damit erscheint auch denkbar, daß vegetative, dysregulatorische Erregungszustände zu einer Sperre der Gallenentleerung führen können. Diese Überlegung berechtigt zu der Frage, ob Substanzen, die die ganglionäre Erregungsübertragung hemmen, die Tätigkeit des Sphincter Oddi und namentlich Spasmen dieses Schließmuskels zu beeinflussen vermögen. Die Beantwortung dieser Frage erschien auch deswegen bedeutungsvoll, weil für die Analyse des Angriffspunktes der früher geprüften, am Sphincter Oddi spasmolytisch wirksamen Pharmaka die Möglichkeit eines ganglionären Angriffs in Betracht zu ziehen war.

Neben den gebräuchlichen ganglienblockierenden Stoffen* Tetraäthylammonium (Acheson u. Moe), Hexamethonium (Paton u. Zaimis[1]) und Pendiomid (Bein u. Meyer) interessierten besonders der auch

* Chemische Bezeichnungen siehe unten.

zur Spasmolyse der Gallenwege empfohlene „vagotrope Ganglienblocker" Buscopan (Wick) sowie das ganglionär wirksame (Stanbury: Mechelke u. Nusser: Hommer) und klinisch zur Gallengewinnung mittels Duodenalsonde gern verwendete Magnesiumsulfat („Meltzer-Lyon-Test"). Diese Applikationsart von Magnesiumsulfat soll auf dem Reflexweg zu deutlich sichtbaren Kontraktionen der Gallenblase führen (Stepp u. Düttmann, Pribram), ein Befund, der namentlich bei der Annahme eines ganglionären Angriffspunktes von Magnesiumsulfat zu überprüfen notwendig schien.

Methodik.

Die Versuche wurden an über 20 Hunden in Morphin (4 mg/kg)-Chloralose (0.08 g kg)-Urethan (0.25 g kg)-Narkose durchgeführt. Registriert wurden gleichzeitig der arterielle Blutdruck, die Darmbewegungen (Ballonmethode), der Tonus der Gallenblase und das den Sphincter Oddi bei konstant gehaltenem Druck von 350 mm H_2O in der Zeiteinheit durchströmende Flüssigkeitsvolumen, indem die in der dazugehörigen Mariotteschen Flasche nachperlenden Luftblasen elektrisch aufgezeichnet wurden. Einzelheiten der benutzten Methodik sind in einer vorausgehenden Mitteilung (Erdmann u. Henne) ausführlich beschrieben worden.

Folgende Stoffe wurden geprüft: Tetraäthylammoniumbromid („Tetramon" Nordmark), Hexamethoniumjodid (C_6), N, N, N′, N′-3-Pentamethyl-N, N′-diäthyl-3-azapentylen-1, 5-diammonium-dibromid („Pendiomid" Ciba), Scopolamin-N-butylbromid („Buscopan" Boehringer) und Magnesiumsulfat (25%ige Lösung). Sämtliche Substanzen wurden in gebräuchlichen mittleren, aber auch in hohen Dosierungen intravenös verabreicht. Bei Buscopan und Magnesiumsulfat interessierte überdies die Wirkung einer duodenalen Applikation. Die aufgeführten Stoffe wurden sowohl an nicht vorbehandelten Tieren wie an Tieren, deren Sphinctertonus durch intravenöse Prostigmininjektionen (0,05 mg/kg) extrem gesteigert worden war, geprüft.

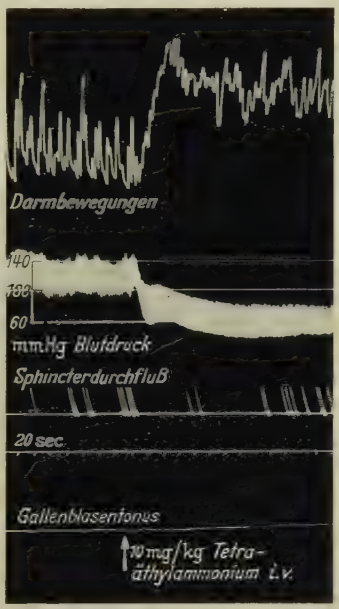


Abb. 1.
Hund, 11 kg. Morphin-Chloralose-Urethan-Narkose. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Prostigminvorbehandlung. Die Wirkung von Tetraäthylammonium auf die Gallenentleerung.

Ergebnisse.

1. Tetramon, Hexamethonium, Pendiomid.

Intravenöse Injektion von Tetraäthylammoniumbromid (5—20 mg/kg) führt, wie aus Abb. 1 hervorgeht, zu nachhaltiger Blutdrucksenkung (von 120 auf 60 mmHg) und ausgeprägter Tonuserhöhung am Darm, die von einer flüchtigen Tonussteigerung des Sphincter Oddi begleitet wird. Der Tonus der Gallenblase zeigt keine abrupten Änderungen, ihre

Reaktionsfähigkeit auf intravenöse Gaben von Neostigmin (Prostigmin) und Histamin pflegt aber nach Verabreichung ganglienblockierender Substanzen über mehrere Stunden stark eingeschränkt zu sein.

Das gleiche Bild bietet die Registrierung der Wirkungen von intravenös injiziertem Hexamethonium (1—5 mg/kg) (vgl. Abb. 3) und Pendiomid (1—5 mg/kg). Vorbehandlung mit Neostigmin ändert die Reaktion der Versuchstiere weder qualitativ noch quantitativ.

2. Buscopan.

Intravenöse Injektion von Buscopan (0,5—1,0 mg/kg) führt in jedem Falle mit Sicherheit zu einem starken Tonusverlust des Sphincter Oddi, was durch die plötzlich einsetzende und nachhaltige hohe Tropfgeschwindigkeit der Durchflußregistrierung gekennzeichnet wird (Abb. 2 und 3). Die Spasmolyse des Schließmuskels wird stets von einer Darmlähmung begleitet (Abb. 3). Eine vorübergehende (4 min dauernde) Blutdrucksenkung (Abb. 2, von 190 auf 110 mmHg) pflegt der Buscopanwirkung auf Sphincter Oddi und Darm parallel zu gehen. Dieser Befund

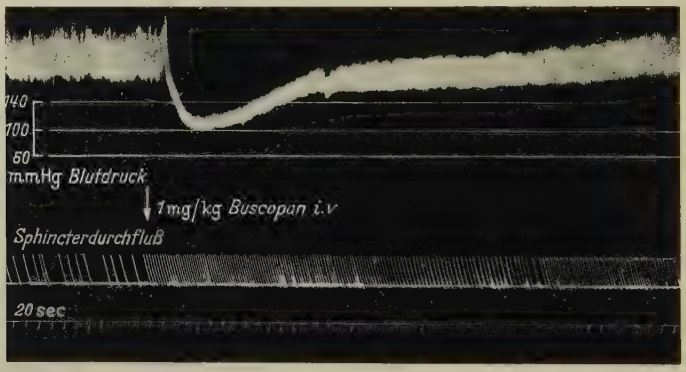


Abb. 2. Hund, 8 kg. Morphin-Chloralose-Urethan-Narkose. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Prostigminvorbehandlung. Die Wirkung von Buscopan auf die Gallenentleerung.

ist jedoch nach Vorbehandlung mit ganglienblockierenden Substanzen (vgl. Abb. 3) nicht mehr zu erheben. Der Tonus der Gallenblase wird durch Buscopan nicht sichtlich verändert. Ihre Reaktionsfähigkeit auf intravenöse Gaben von Prostigmin und Histamin ist für die Dauer der Buscopanwirkung (etwa 30—50 min) eingeschränkt.

Um den Wirkungscharakter von Buscopan näher zu analysieren, wurde die Kreislaufwirkung von intravenösen Acetylcholin-Testinjektionen vor und nach eben spasmolytisch wirksamen Buscopandosierungen (0,5 mg/kg i. v.) geprüft. Es zeigte sich, daß die Acetylcholinwirkung auf den Blutdruck in diesem Dosierungsbereich von Buscopan bereits völlig aufgehoben ist.

Buscopan ist auch bei Injektion in den Ductus choledochus oder in das Duodenum (0,5 cm³ der Lösung 10^{-3} 0,5 mg) gut spasmolytisch wirksam. Dabei sind natürlich keine Kreislaufwirkungen zu erwarten.

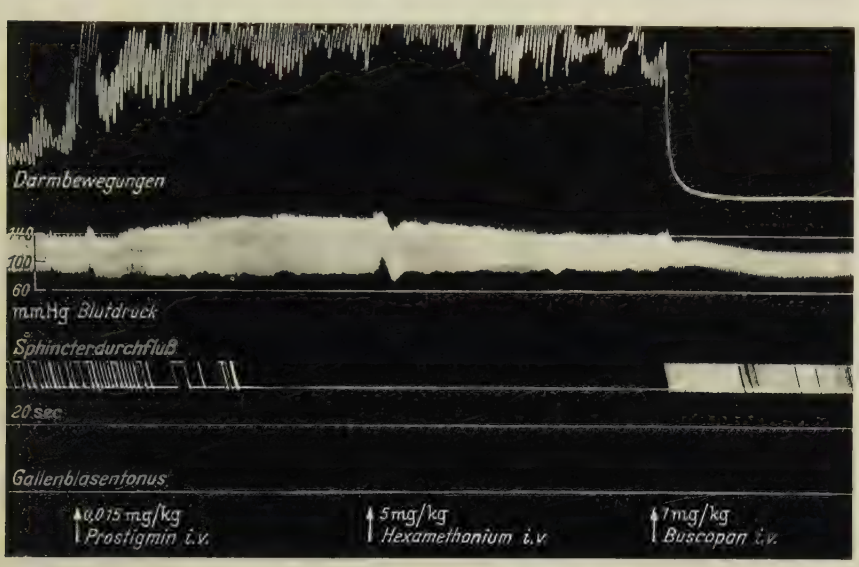


Abb. 3. Hund, 11 kg. Morphin-Chloralose-Urethan-Narkose. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Vorbehandlung (60 min zuvor): 10 mg/kg Tetraäthylammonium intravenös. Die Wirkung von Prostigmin, Hexamethonium und Buscopan auf die Gallenentleerung.

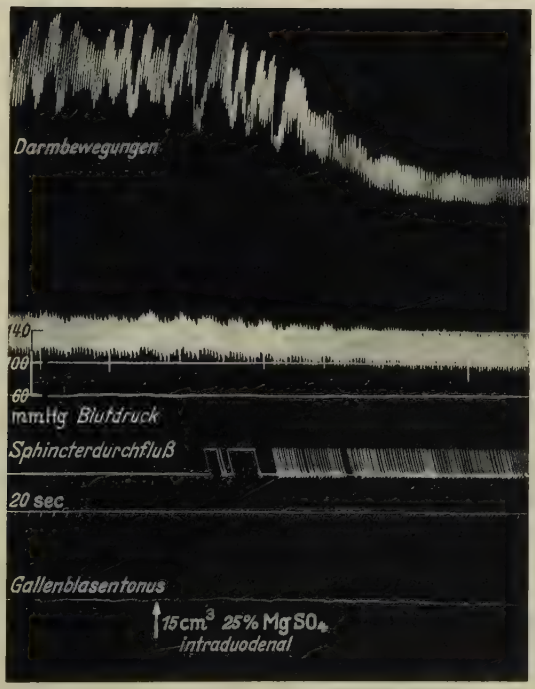


Abb. 4. Hund, 10 kg. Morphin-Chloralose-Urethan-Narkose. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Keine Prostigminvorbehandlung. Die Wirkung duodenaler Applikation von Magnesiumsulfat auf die Gallenentleerung.

3. Magnesiumsulfat.

Intravenöse Injektion von Magnesiumsulfat (10 mg/kg) führt zu einer Öffnung des Sphincter Oddi, zu Blutdrucksenkung und Darmlähmung. Bei lokaler Applikation von Magnesiumsulfat (15 cm^3 der 25%igen Lösung) in das Duodenum kommt es nach einer Latenz von 2—3 min zu einer zunehmenden Lösung des Sphincterspasmus und einer deutlichen Abnahme des Darmtonus bei erhaltener Automatie (Abb. 4). Gleichzeitig setzt eine langsam fortschreitende Blutdrucksenkung (von 160 auf 120 mmHg) ein. Der Tonus der Gallenblase, dessen Empfindlichkeit auf intravenöse Injektionen von Adrenalin, Histamin und Prostigmin mehrfach überprüft wurde, zeigt dabei keinerlei Änderungen.

Diskussion.

Zu 1. Die Wirkung von ganglienblockierenden Substanzen auf die Gallenentleerung ist unseres Wissens bisher nicht pharmakologisch geprüft worden. Ihre Wirkung auf die Visceralmotilität von Magen und Darm ist dagegen bekannt. Sie variiert bei den einzelnen Tierarten. Nach Mechelke und Nusser entspricht die sichtbare Wirkung einer Ganglienblockade auf den Kreislauf der Blockade des jeweils vorherrschenden vegetativen Tonus. Diese Deutung kann möglicherweise auch zur Erklärung der unterschiedlichen Wirkung ganglionär hemmender Stoffe auf die Visceralmotorik verschiedener Spezies herangezogen werden (vgl. auch Wien u. Mason).

Ganglienblocker wirken nach Paton und Zaimis auf den Kaninchendarm lähmend, auf die Motilität des Magens und Darms der Katze (Sympathicustier!) erregend, auf die Motilität des Magens und Darms vom Hund (Vagustier!) und Menschen dämpfend.

Moe und Freyburger fanden am Hund in Morphin-Urethan oder Morphin-Chloralose-Narkose eine erregende Wirkung ganglienblockierender Stoffe auf den Darm, die sie als Folge einer Blockade „sympathischer Tonisierung" ansehen. Auch zur Durchführung unserer Versuche war eine Morphin-Chloralose-Narkose gewählt worden. Wenn diese Vorbehandlung also geeignet ist, eine sympathische Tonisierung herbeizuführen, so wäre in der Tat denkbar, daß eine Blockade der Ganglien den jetzt vorherrschenden Sympathicotonus zu löschen vermag: eine erregende (parasympathische) Wirkung auf die Darmmotilität, wie sie sich in unseren Versuchen zeigte, würde resultieren.

Diese Überlegungen berücksichtigen nicht die ebenfalls zu unseren Versuchsbedingungen gehörende Prostigmingaben, deren Wirksamkeit sich in spastischer Peristaltik und Tonuserhöhung des Darms, Sphincterverschluß und eventuell in Vaguspulsen zu erkennen gab. Ganglienblockade löschte den parasympathischen Tonus jedoch nicht, wie man nach obigen Ausführungen vielleicht hätte erwarten können.

Die Konstruktion weiterer Tonustheorien — unter Hinweis auf Unterschiede zwischen zentral diktiertem und intramural-autonom gesteuerten Tonus — wäre zu spekulativ.

Auch bei Beachtung der bekannten Empfindlichkeitsunterschiede sympathischer und parasympathischer Ganglien gegen Ganglienblocker kommt die Möglichkeit, daß die parasympathischen Ganglien (Vagustonus!) bei der verwendeten Dosierung von Tetraäthylammonium, Hexamethonium oder Pendiomid noch nicht blockiert sein könnten, nicht in Betracht. Nach Untersuchungen von Bein und Meyer[2], Kay und Smith, Erdmann und Mercker sind mit den hier verwendeten Ganglienblockerdosen auch die parasympathischen Ganglien mit Sicherheit blockiert.

Es muß jedenfalls betont werden, daß ganglienblockierende Substanzen die Darmautomatie in vitro erst in Konzentrationen ab 10^{-3} lähmen (Bein u. Meyer[1]), in Konzentrationen also, die selbst bei hoher Dosierung am Ganztier nicht zu erreichen sind.

Busse, Wolf und Lendle fanden am isolierten Meerschweinchendünndarm (nach Trendelenburg) für Hexamethonium und Pendiomid lähmende Konzentrationsbereiche von $2{,}5—5 \times 10^{-6}$. Allerdings machte die Aufhebbarkeit dieser Peristaltiklähmung durch muskelerregende Pharmaka (z. B. Histamin) einen ganglionären Angriff von Hexamethonium und Pendiomid unwahrscheinlich. Unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen am narkotisierten Tier lähmen Ganglienblocker die Darmmotilität nicht (im Gegenteil!). Die eindrucksvollen Versuche von Moe und Freyburger zeigen überdies, daß die durch Vagusreizung auslösbare Steigerung der Duodenalmotilität des Hundes durch Tetraäthylammonium nicht beeinflußt wird.

Diese Beobachtungen berechtigen zu der Annahme, daß zumindest die intramuralen Ganglien, die die Darmmotorik steuern, gegen eine Blockade durch Tetraäthylammonium, Hexamethonium oder Pendiomid recht unempfindlich sind. Da auch die Motilität des Sphincter Oddi durch diese Substanzen nicht gelähmt wird, kann analog geschlossen werden, daß *die Motorik des Schließmuskels ebenfalls zunächst einer intramuralen, nervösen Steuerung unterliegt.* Der isolierte Sphincter Oddi behält in der Tat auch in vitro Tonus und eine gewisse Automatie bei (eigener Befund).

Der Tonus der Gallenblase wird in unserer Versuchsanordnung durch die ganglienblockierenden Stoffe nicht deutlich beeinflußt. Dagegen ist die Reaktionsfähigkeit der Gallenblase nach Verabreichung von Ganglienblockern aufgehoben, ein Befund, der *für eine ganglionäre Steuerung dieses Hohlorgans* spricht.

Zu 2. In scharfem Gegensatz zu den eben besprochenen, am Sphincter Oddi unwirksamen Ganglienblockern stehen die mit dem „vagotropen Ganglienblocker" Buscopan erhaltenen Ergebnisse. Schon die unbedingte Sicherheit, mit der die Applikation von Buscopan zu einer Spasmolyse, ja Lähmung von Schließmuskel und Darm führt, erst recht die überaus schnelle lokale Wirksamkeit lassen an einem ganglionären Wirkungsmechanismus zweifeln. Die Tatsache einer aufgehobenen Acetylcholinwirkung auf den Blutdruck zeigt, daß zumindest bei der von uns

gewählten Versuchsanordnung und Buscopandosierung (0,5—1,0 mg/kg i. v.) *kein ganglionärer, sondern ein atropinartiger Wirkungsmechanismus* für den Buscopaneffekt auf die Gallenentleerung verantwortlich zu machen ist.

Diese Feststellung widerspricht nicht den Ergebnissen der Untersuchungen von Wick; Nolte und Hasireiter; Hardt und Hotovy, wonach Buscopan *auch* ganglionär hemmende und Antinicotinwirkungen besitzt. Die Intensität der ganglionär lähmenden Eigenschaften von Buscopan entspricht jedoch eher einer Nebenwirkung, wie sie für alle atropinartigen Substanzen charakteristisch ist. Bein, Gross, Schuler und Tripod haben daher darauf hingewiesen, daß die Bezeichnung „Ganglienblocker" für das Hyoscin-N-butylbromid (= Buscopan) eigentlich nicht zutreffend ist.

Zu 3. Die intravenöse Injektion von Magnesiumsulfat führt in einer Dosierung (10 mg/kg), die bekanntlich noch nicht zentral narkotisch, nach Stanbury aber bereits ganglionär hemmend wirkt, zu Blutdrucksenkung, ausgeprägter Spasmolyse von Darm, Sphincter Oddi und Gallenblase. Der Darmtonus wird dabei stärker gelähmt als die Automatie, ein Befund, der auch aus den Untersuchungen von Straub und Schild am Meerschweinchendarm in situ hervorgeht. Es ist sowohl im Hinblick auf den sogenannten „Magnesiumsulfatreflex" der Gallenblase wie im Hinblick auf die Möglichkeit einer ganglienblockierenden Wirkung von Magnesiumsulfat interessant, daß es bei seiner intravenösen Injektion zu einer Erschlaffung der Gallenblase kommt.

Magnesiumsulfat besitzt nach Stanbury, Mechelke und Nusser, Hommer, Cloetta, Fischer und v. d. Loeff u. a. ganglionär hemmende Eigenschaften. Ein solcher Wirkungsmechanismus kommt für die Deutung der spasmolytischen Wirksamkeit von lokal appliziertem Magnesiumsulfat auf den Sphincter Oddi aus folgenden Gründen nicht in Betracht:

1. Die mit Sicherheit ganglienblockierenden Stoffe (s. unter 1) zeigen keinen spasmolytischen Effekt am Spinhcter Oddi oder Darm.

2. Magnesiumsulfat senkt ausschließlich den Tonus des Darmes, ohne die Automatie zu lähmen. Nach Feldberg und Lin sollen ganglionär oder nervös wirksame Stoffe aber in erster Linie die Automatie des Darmes und nicht seinen Tonus beeinflussen, während es für muskulär angreifende Spasmolytica typisch sei, daß sie zuerst den Längsmuskel, d. h. den Darmtonus lähmen[1] (v. Hof); v. Hof und Schneider haben daher die spasmolytische Wirkung von Magnesiumsulfat auf den Darm einem rein muskulären Angriffspunkt von Magnesiumsulfat zugeschrieben.

Im Zusammenhang mit der muskulär spasmolytischen Wirksamkeit von Magnesiumsulfat bei lokaler Applikation in das Duodenum bedarf die Frage des sog. „Magnesiumsulfatreflexes" der Gallenblase einer kritischen Würdigung.

---

[1] Die durch Magnesiumsulfat bewirkte Minderung des Darmtonus wird die Auslösung eines Peristaltikreflexes vermutlich unmöglich machen (Straub u. Schild; Busse, Wolf u. Lendle).

Nach den Untersuchungen von Stepp und Düttmann (am Hund und Menschen) und Pribram (am operierten Patienten) löst die intraduodenale Applikation von Magnesiumsulfat eine Gallenblasenkontraktion aus, die zu einer Gallenentleerung in den Darm führt. Dieser Reflex ist in der Klinik als „Meltzer-Lyon-Test" (40 cm^3 einer 33%igen $MgSO_4$-Lösung durch Sonde in das Duodenum) zur Gewinnung von Blasengalle bekannt. Auch Bayer hat sich auf Grund seiner elektrocholecystographischen Untersuchungen für einen aktiven Entleerungsmechanismus der Gallenblase ausgesprochen.

Diesen Befunden stehen die Beobachtungen von Winkelstein, Schreiber, Haberland u. a. gegenüber, die der Gallenblase lediglich eine passive Mitwirkung bei der Gallenentleerung zuschreiben. Einhorn fand, daß Magnesiumsulfat auch nach Exstirpation der Gallenblase zum typischen Gallenfluß führt. Auster und Crohn teilten mit, daß in die Gallenblase injiziertes Methylenblau trotz Gallenfluß nach Magnesiumsulfat nicht erscheint. Nach Brugsch und Horsters ist Magnesiumsulfat als Cholagogum wirksam: es setze den Tonus von Darm und Sphinctergebiet herab, führe damit zum Gallenfluß, aber mit Sicherheit zu keiner Gallenblasenkontration. Mit einer Methodik, die der von uns verwendeten am nächsten kommt, hat Reach die Wirkung von Magnesiumsulfat auf den Sphincter Oddi des Meerschweinchens untersucht. Er fand wie wir eine Durchflußbeschleunigung der den Schließmuskel durchströmenden Wassermenge ohne Anzeichen einer Gallenblasenkontraktion.

Nach diesen Befunden erscheint es verfehlt, von einem „Gallenblasenreflex" nach Magnesiumsulfat zu sprechen. Magnesiumsulfat führt bei duodenaler Applikation zu einer direkt-muskulären Lähmung des Sphincter Oddi und des umgebenden Duodenalgebietes. Der Ausfall des Schließmuskelwiderstandes wird zu einem Abstrom der Galle in den Darm führen und dabei infolge eines dem Heber- (Schreiber) oder Wasserstrahlpumpen-Prinzip (Haberland) ähnlichen Mechanismus auch zu einer Entleerung der Gallenblase führen können.

Bei Verwendung von Methoden, zu deren Voraussetzung die Unterbindung von Ductus cysticus oder choledochus gehört, wird demnach auch keine „Kontraktion" der Gallenblase zu beobachten sein. Es sei an dieser Stelle auf die ausführlichen anatomischen und physiologischen Untersuchungen der Gallenblasenmotilität von Schreiber hingewiesen, der zu dem Problem der Mechanik der Gallenentleerung in den Dünndarm kritisch Stellung genommen hat.

Zusammenfassung.

Am narkotisierten Hund wurden Blutdruck sowie Motilität und Tonus von Gallenblase, Sphincter Oddi und Duodenum registriert.

1. Die ganglienblockierenden Stoffe Tetraäthylammonium, Hexamethonium und Pendiomid fördern selbst in hohen Dosen die Gallenentleerung nicht. Sie vermögen künstlich gesetzte Sphincterspasmen nicht zu beeinflussen.

2. Scopolamin-N-butylbromid („Buscopan") führt in jedem Falle zu ergiebiger (atropinartiger) Spasmolyse des Schließmuskels und des Darmes mit dementsprechender Gallenentleerung.

3. Intraduodenale Applikation von Magnesiumsulfat setzt den Tonus von Sphincter Oddi und Duodenum herab und führt damit zum Gallenfluß. Ein „Magnesiumsulfatreflex" der Gallenblase ist nicht nachweisbar.

Literatur.

Acheson, G. H., and G. K. Moe: J. of Pharmacol. **87**, 220 (1946). — Auster, L. S., and B. B. Crohn: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **19**, 117 (1922); ref. Ber. Physiol. **13**, 90 (1922). — Bayer, R.: Pflügers Arch. **238**, 598 (1937). — Bein, H. J., u. R. Meyer (1): Experientia, Basel **6**, 351 (1950). — Bein, H. J., u. R. Meyer (2): Schweiz. med. Wschr. **81**, 446 (1951). — Bein, H. J., F. Gross, W. Schuler u. J. Tripod: Schweiz. med. Wschr. **82**, 1143 (1952). — Brugsch, Th., u. H. Horsters: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **118**, 305 (1926). — Busse, W., J. Wolf u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 177 (1953). — Cloetta, M., H. Fischer u. M. R. v. d. Loeff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 6 (1942). — Einhorn, M.: N. Y. Med. J. **113**, 313 (1921); ref. Ber. Physiol. **7**, 575 (1921). — Erdmann, W.-D., u. H. F. Henne: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **1953** im Druck. — Erdmann, W.-D., u. H. Mercker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 563 (1952). — Feldberg, W., and R. C. Y. Lin: Brit. J. Pharmacol. **4**, 33 (1949). — Geissendörfer, R.: Chirurg **21**, 344 (1950). — Haberland, H. F. O.: Z. exper. Med. **105**, 303 (1939). — Hardt, A., u. R. Hotovy: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 264 (1950). — Henne, H. F., u. W.-D. Erdmann: Klin. Wschr. **1953**, 174. — Herrmann, K. O.: Ärztl. Forschg., Wörishofen **1952**, 261. — v. Hof, Cl.: Diss. Göttingen 1951. — v. Hof, Cl., u. H. H. Schneider: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 176 (1952). — Hommer, E.: Klin. Wschr. **1948**, 22. — Kay, A. W., and A. N. Smith: Brit. Med. J. **4651**, 460 (1950); ref. Ber. Physiol. **147**, 179 (1951/52). — Lester, L. J., and R. Colp: Arch. Surg. **1952**, 64. — Mechelke, K., u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 1 (1951). — Mendenhall, W. L. 1926: Zit. nach T. Sollmann. „A Manual of Pharmacology", Philadelphia a. London **1948**, S. 747. — Moe, G. K., and W. A. Freyburger: Pharmacol. Rev. **2**, 61 (1950). — Nolte, G. u. E. Haslreiter: Dtsch. med. Wschr. **77**, 208 (1952). — Paton, W. D. M., and E. Zaimis (1): Brit. J. Pharmacol. **4**, 381 (1949). — Paton, W. D. M., and E. Zaimis (2): Pharmacol. Rev. **4**, 219 (1952). — Pribram, E.: Klin. Wschr. **1923**, 1590. — Reach, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **100**, 379 (1923). — Schreiber, H.: Klin. Wschr. **1943**, 511. — Schüpbach, A.: Schweiz. med. Wschr. **82**, 321 (1952). — Stanbury, J. B.: J. of Pharmacol. **93**, 52 (1948). — Stepp, W., u. G. Düttmann: Klin. Wschr. **1923**, 1587. — Straub, W., u. H. Schild: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 9 (1933). — Wien, R., and D. F. J. Mason: Brit. J. Pharmacol. **6**, 611 (1951). — Wick, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 485 (1951). - Winkelstein, A.: Klin. Wschr. **1923**, 406.

Dr. W.-D. Erdmann, Pharmakol. Institut d. Univ. Göttingen, Geiststr. 9.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 193—194 (1953).

Aus der Med. Univ.-Klinik Freiburg i. Brsg.
(Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer).

Vorrichtung zum mechanischen Druckausgleich am isoliert durchströmten Herzen nach Langendorff.

Von
Günter Hoffmann.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. März 1953.)

Bei Versuchen an isolierten Meerschwein- und Rattenherzen in der Anordnung nach Langendorff ist der Druckausgleich für die mit Sauerstoff durchperlte Herzkanüle immer recht schwierig. Benutzt man zum O_2-Abfluß ein Glasrohr, welches in ein mit Wasser gefülltes Gefäß

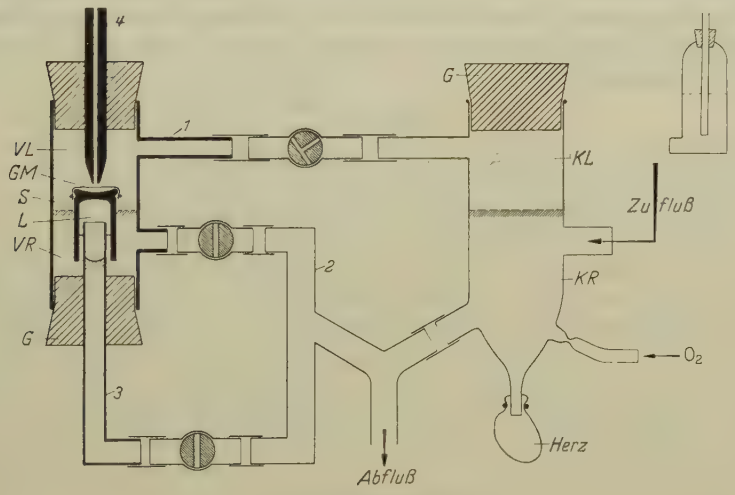


Abb. 1. Vergleiche Text.

versenkt ist (Genuit), so ist die Länge sehr störend, das Rohr muß ja soviel Zentimeter lang sein, wie der Durchströmungsdruck in Zentimeter Wasser beträgt. Dazu ist die Bedienung sehr umständlich, wenn man den Druck variieren will.

Nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren konstruierten wir ein Ventil, welches unabhängig vom Durchströmungsdruck den Sauerstoff entweichen läßt.

Die Ringer-Lösung in der Zuflußkanüle (*KR*) steht über *2* u. *3* mit der im Ventil (*VR*) in Verbindung, desgleichen der Luftraum *KL* über *1* mit *VL*. Änderungen des Flüssigkeitsspiegel in der Zuflußkanüle werden daher immer parallel verlaufende Änderungen im Ventil zur Folge haben. Über dem Rohr *3* befindet sich ein Schwimmer (*S*), dessen Gummimembran (*GM*) den Luftraum (*VL*) gegen die Verbindung mit der Außenluft (*4*) abschließt. Der *KR* zugeführte Sauerstoff verläßt über *KL*, *1*, *VL*, *4* das System. Sinkt der Flüssigkeitsspiegel, so kann der Sauerstoff schneller entweichen, da der Schwimmer (*S*) sinkt und *4* freigibt, dadurch sinkt aber auch der Druck in *KL* und *VL* und der Flüssigkeitsspiegel wird wieder steigen, was den O_2-Abfluß hemmt.

Durch entsprechende Bedienung des Hahnes an Rohr 3 läßt sich bei der Füllung des Systems die Luftblase (*L*) unter dem Schwimmer (*S*) verändern und damit auch die Empfindlichkeit des Schwimmers. Die Gummimembran (*GM*) des Schwimmers sitzt auf einem blinden Stück, so daß ein Entweichen der Luftblase nicht möglich ist. Durch den Abfluß läßt man zweckmäßigerweise während des Versuches langsam Ringer durchströmen, es kann so keine Giftlösung zurückfließen, und der Druckausgleich funktioniert auch bei Sistieren des Coronardurchflusses gut. Nach Abnahme der Gummistopfen (*G*) läßt sich das Ventil sehr leicht reinigen.

Literatur.

Genuit, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 285, 302 (1938).

Dr. Günter Hoffmann, Med. Univ.-Klinik Freiburg im Breisgau.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 195—206 (1953).

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.-G., Berlin-West.

2,4,6-Trijod-3-acetaminobenzoesäure-Abkömmlinge als Kontrastmittel*.

Von

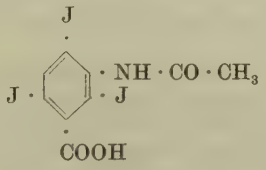
H. Langecker, A. Harwart und K. Junkmann.

(Eingegangen am 8. April 1953.)

Während für die Darstellung des Magendarmkanals im Röntgenbild im Bariumbrei bald ein brauchbares und ungiftiges Präparat zur Verfügung stand, bereitete die Anpassung der Kontrastmittel an andere Hohlräume viel größere Schwierigkeiten. Dies äußert sich in der Fülle der für die Ausscheidungsradiographie vorgeschlagenen Stoffe (vgl. Zusammenfassung bei Hecht[7]). Neuerdings sind für die Urographie 2,4,6-Trijod-3-acetaminobenzoesäure (I)[11, 13, 14, 19] und für die Cholecystographie: 3-(3-Amino-2,4,6-trijodphenyl)-2-äthylpropionsäure[2, 18, 16, 4, 10], 2-(4-Hydroxy-3,5-dijodbenzyl)-cyclohexancarbonsäure[15, 20], α-4-Hydroxy-3,5-dijodbenzyl-n-buttersäure[6] und α-4-Hydroxy-3,5-dijodbenzyl-n-capronsäure[6] empfohlen worden.

Im Laufe unserer eigenen seit Jahren fortgesetzten Untersuchungen über jodhaltige Kontrastmittel haben wir auch die Angaben des Schrifttums[11, 13, 14, 19] über I nachgeprüft und ergänzt. Dabei stießen wir anläßlich der Untersuchung von Derivaten auf das Adipinsäure-di-(3-carboxy-2,4,6-trijodanilid) (II) als eine sehr wenig giftige und bei i. v. Verabreichung für die Cholecystographie besonders geeignete Verbindung. Nachstehend seien unsere Erfahrungen über I als Stammsubstanz und über II als neues Gallenwegsdiagnosticum wiedergegeben.

A) 2,4,6-Trijod-3-acetaminobenzoesäure ($C_9H_6O_3NJ_3$). (I)



68,4% Jod, Mol. Gew. 557, bildet farblose, geruchlose, bitterschmeckende, nadelförmige Kristalle, F.P. 278—83°.

Über den Dissoziationsgrad (α), die Gefrierpunktserniedrigung ($-\Delta T$) und den osmotischen Druck in Atmosphären (P_0) unterrichtet Tabelle 1.

* Herrn Prof. Karl Thomas zum 70. Geburtstag.

I zersetzt sich beim Schmelzen; oberhalb 200° wird Jod abgespalten; es ist optisch inaktiv. Bei 25° löst Wasser von der freien Säure 128 mg%, bei 50° 180 mg%, bei 100° 300 mg%. Bei Zimmertemperatur löst Äthylalkohol 3,3% bei 80° 7,4%, Äther 34 mg%, Benzol 52 mg%. Das Na-Salz ist bei 25° 74,6%ig (g/Vol) in Wasser löslich.

Tabelle 1.

g% Natriumsalz	Molarität	$-\Delta T$	α	P_0
4,96	0,0855	0,318	1,00	3,79
8,15	0,1405	0,500	0,91	5,95
9,50	0,1638	0,557	0,83	6,64
14,25	0,2469	0,820	0,79	9,76
29,76	0,5130	1,670	0,75	18,80

Eine 9,5%ige Lösung ist mit physiologischer Kochsalzlösung isoton.

Bezüglich Brechungskoeffizienten (bei 21,5° C) siehe folgende Tabelle:

Tabelle 2.

Substanz	g/100 cm³	n_D
freie Säure (Methanol-Lösg.)	0,0	1,3278
	2,33	1,3320
	4,41	1,3357
	6,23	1,3387
	8,30	1,3427
Na-Salz (wäßrige Lösung)	0,0	1,3324
	4,96	1,3400
	9,50	1,3460
	14,25	1,3550
	29,75	1,3781
	50,00	1,4076

Für den *Nachweis* in Harn, Galle und Blut wurde folgende Methode benutzt, die ganz allgemein für im Kern jodierte aromatische Substanzen brauchbar ist. Prinzip: oxydative Abspaltung des Jods bei stark schwefelsaurer Reaktion mit ges. Kaliumpermanganat im kochenden Wasserbad 60 min. Reduktion des Permanganats und MnO_2 mit Nitrit, Entfernen des Nitrits mit sulfaminsaurem Ammon und jodometrische Bestimmung des Jodats. 1 cm³ 0,002 nNa-Thiosulfat = 42 γ Jod = 61,4γ I.

Für den Nachweis von I im Blut und Serum wurde mit Zinkhydroxyd nach Somogyi[17] bzw. mit Cadmiumsulfat nach Fujita Iwatake[5] enteiweißt.

Die Abspaltung des Acylrestes kontrollierten wir durch Diazotierung und Kupplung mit α-Naphthyläthylendiamindihydrochlorid (Langecker[9a]). Als Vergleichssubstanz diente 2,4,6-Trijod-3-aminobenzoesäure.

Resorption. Nach peroraler Verabreichung bei Ratte und Kaninchen wird I schlecht, nach subcutaner und intratrachealer Gabe gut resorbiert (vgl. Tab. 5).

Die Verteilung von I wurde in vitro an den Phasen des Blutes untersucht, das durch Zentrifugieren und Ultrafiltrieren in Erythrocyten,

Plasma und Ultrafiltrat getrennt wurde. Der sich für die einzelnen Fraktionen ergebende prozentuelle Anteil wurde berechnet (WITZGALL[21]).

Die Adsorption der Filter (Ultracellafeinstfilter, Membranfiltergesellschaft Göttingen, Porengröße 5—10 mμ, auf Eiweißdichtigkeit geprüft) gegenüber I wurde in wäßrigen Lösungen verschiedener Konzentrationen festgestellt und die ermittelten Plasmaultrafiltrate entsprechend korrigiert.

Tabelle 3. *Die Verteilung von I auf die Phasen des Hunde- und Menschenblutes in vitro.*

Hund Nr.	mg% Blut	Prozent der Gesamtmenge			Patient Nr.	mg% Blut	Prozent der Gesamtmenge		
		Erythrocyten	Plasma-Eiweiß	Ultra-Filtrat			Erythrocyten	Plasma-Eiweiß	Ultra-Filtrat
1 (39)[1]	41,0	8,5	35,4	56,0	1 (33)[1]	20,0	4,5	71,6	23,6
	20,0	7,3	44,3	48,4		10,7	0,8	80,5	18,5
	9,5	10,1	49,5	40,5					
2 (40)[1]	41,0	2,3	—	—	2 (37)[1]	37,0	—	67,2	36,8
	22,0	12,7	—	—		26,8	—	78,5	30,3
3 (47)[1]	44,2	9,3	44,7	46,3	3 (30,5)[1]	42,7	11,4	65,1	24,9
	30,9	2,1	54,6	43,1		21,8	23,4	54,4	22,2
	18,2	—	76,0	47,1					
	10,2	—	68,9	36,1					
4 (37)[1]	14,7	11,3	34,6	54,1	4 (45)[1]	6,9	—	65,2	39,8
	7,1	9,9	45,2	44,9					
5 (36)[1]	20,6	—	51,0	—					
	10,5	11,7	40,8	47,2					

[1] Die Zahl in der Klammer bedeutet Hämatokritwert zu Beginn des Versuches.

Außerdem wurde am nierenlosen Hund der Verlauf des Verteilungsvorganges nach i. v. Verabreichung des Natriumsalzes untersucht (LANGECKER[9b]).

Tabelle 4. *Die Verteilung von I beim nierenlosen Hund nach i. v. Verabreichung.*

Hund Nr.	Dosis mg/kg	Zeit Minuten	mg%			Vert. Vol. % Körpergewicht	Liquor mg%
			Blut	Plasma	Ultra-Filtrat		
1 (49)[1]	95	20	26,6	58,0	—	32,8	—
		50	23,8	45,6	—	37,2	—
		120	21,5	43,6	21,7	44,0	0,23
2 (42)[1]	92	20	26,0	49,5	—	28,0	—
		50	18,8	41,0	—	47,0	—
		120	20,0	38,2	11,8	46,0	2,6
3 (43)[1]	100	20	37,5	78,4	—	23,0	—
		50	30,0	64,1	—	31,1	—
		120	27,2	59,0	29,8	36,8	—

[1] Die Zahl in der Klammer bedeutet Hämatokritwert am Ende des Versuches.

Aus den Tabellen ergibt sich, daß I mäßig an Plasmaeiweiß, weniger stark an die Erythrocyten adsorbiert wird. Daß die Bindung an die Erythrocyten sehr rasch erfolgt, geht daraus hervor, daß die Konzentration sich in ihnen kaum ändert, wenn die Verteilung sofort und nach 2 Std bestimmt wird. Die Verteilung im Körper erfolgt rasch und erreicht in 50 min ein Verteilungsvolumen zwischen 31 und 47% des Körpergewichts. — Die im Liquor cerebrospinalis ermittelte Höchstkonzentration lag bei 2,6 mg%, entsprechend einem Plasmaspiegel von 38 mg%.

Die Ausscheidung durch Harn und Galle wird in folgenden Zusammenstellungen wiedergegeben:

Tabelle 5.

Versuchs-Objekt	Dosis g/kg	Verabreichungsart	Zeit nach Injektion Stunden	Prozent der Eingabe in Harn	Galle
Ratte	1,0	i. v.	6	43,6	—[1]
			24	51,0	—
Ratte	1,0	subc.	6	56,5	—
Ratte	1,0	p. os	24	6,0	—
Kaninchen	1,0	i. v.	6	83,0	—
Kaninchen	1,0	i. v.	24	92,4	1,7
Kaninchen	4,0	i. v.	18	90,3	—
Kaninchen	2,0	i. v.	1/6	7,8	—
Kaninchen	1,0	p. os	24	6,2	0,16
Hund	4,0	i. v.	4	50,0	—
			20	73,0	—
Hund	175 mg	i.tracheal	6	14,8	—
			24	18,6	—
Mensch	5,57	i. v.	11	93,5	—
Mensch			7	104,0	—
Mensch			7	80,0	—

[1] Nicht untersucht.

Aus den Ausscheidungsprotokollen ergibt sich die gute Harnfähigkeit des I. Zur Klarstellung des Ausscheidungsmechanismus in der Niere wurde die Clearance von exogen zugeführtem Kreatinin und I bei gleichzeitiger i. v. Injektion bzw. Infusion am Hund bestimmt. Bei Plasmaspiegeln zwischen 1,7—2,6 mg% I und normaler Kreatinin-Clearance betrug das Verhältnis Kreatinin: I-Clearance 1,16—0,53. Mit sinkendem Blutspiegel nahm die Clearance von I zu, auch wenn nur die Plasma- und nicht die Ultrafiltratkonzentration der Berechnung zugrunde gelegt wurde. Viel größer ist der Unterschied gegenüber der Kreatinin-Clearance, wenn man die Ultrafiltratkonzentrationen von I und Kreatinin bei der

Berechnung verwendet. Wird doch I zu 40—50% an Plasmaeiweiß gebunden, während nach KENNEDY[8] Kreatinin nur zu 5% gebunden wird. Die Clearance-Versuche sprechen für eine Teilnahme der Tubuli an der Nierenausscheidung, was der Annahme von NEUHAUS[12] recht geben würde.

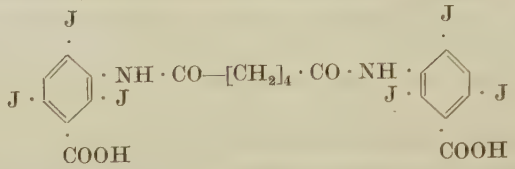
Eine Abspaltung des Jods bzw. Acyls im Stoffwechsel konnte weder bei den untersuchten Laboratoriumstieren noch beim Menschen durch Harnuntersuchung festgestellt werden. Aus menschlichem Harn war die Verbindung durch Ausfällen mit Schwefelsäure und Umkristallisieren aus Alkohol so weit zu reinigen, daß eine Substanz vom Äquivalentgewicht 532 (Soll 557), einem Jodgehalt von 67,2% (Soll 68,4) und einem F.P. von 258° erhalten wurde.

Lokale Verträglichkeit. Von Ratte, Hund und Kaninchen wurden nach intramuskulärer Verabreichung 0,1 bzw. 0,5 cm³ 40%iger Lösung des Na-Salzes schmerzlos vertragen. Am Kaninchenohr bzw. an der Meerschweinchenbauchhaut wurde die intracutane Injektion von 0,1 cm³ der gleichen Lösung reizlos vertragen. 1 Tropfen davon blieb im Kaninchenauge ohne lokale Reizwirkung. Eine 10%ige Lösung (in physiologischer Kochsalzlösung) machte an Kaninchen-Erythrocyten innerhalb 24 Std keine Hämolyse und veränderte die osmotische Resistenz nicht.

Allgemeine Verträglichkeit. Ratte g/kg in 5 min i. v.: 16,0 — 6/6, 11,2 = 3/6, 8,0 = 0/6, LD 50 demnach 11,6 g/kg. Von 3 Kaninchen wurden 4,0 g/kg i. v. gut vertragen. Je ein Hund zeigte nach 4,0 und 2,0 g pro kg i. v. Gähnen, Erbrechen und rasche Erholung, 1 g/kg wurde ohne Erscheinungen vertragen. BYRNE[1] berichtet über gute lokale Verträglichkeit von I beim Meerschweinchen. Nach ihm werden 0,2 g/kg täglich subcutan durch 7 Tage ohne Nierenschaden vertragen, 2,1 g/kg bewirkten tubuläre Nekrosen.

Pharmakologische Wirkungen. An Katzen in Pernocton-Narkose trat nach 50 mg/kg eine geringfügige Blutdrucksenkung ein. 100—400 mg/kg senkten den Blutdruck für 1 min, die Atmung blieb unbeeinflußt. Nach 1 g/kg sank der Blutdruck vorübergehend um 40 mm Hg ab, nach 2 g/kg war die Senkung beträchtlich, die Atmung wurde unregelmäßig und 4 g/kg führten unter Blutdrucksenkung zum Tode. An einem von 2 Straubherzen kam es erst in Konzentrationen von 10^{-2} zur Abnahme der Hubhöhen. Am Kaninchendünndarm waren Konzentrationen von 5×10^{-3} wirkungslos, 10^{-2} bewirkten schwachen Tonusanstieg. Am Meerschweinchendünndarm waren 10^{-3} wirkungslos, 5×10^{-3} bewirkten schwachen Tonusanstieg und 10^{-2} starken Tonusanstieg. Der durch Barium am Meerschweinchendarm ausgelöste Spasmus konnte durch I nicht beeinflußt werden. Am Meerschweinchenuterus waren 10^{-3} wirkungslos, 5×10^{-3} bewirkten schwachen und 10^{-2} starken Tonusanstieg.

B) Adipinsäure-di-(3-carboxy-2,4 6-trijodanilid) $C_{20}H_{14}O_6N_2J_6$ (II)



66,9% Jod, Mol.Gew. 1140, bildet farb-, geruch- und geschmacklose Kristalle. F.P. 289—290° unter Zersetzung.

Über den Dissoziationsgrad (α), die Gefrierpunktserniedrigung ($-\Delta T$) und den osmotischen Druck in Atmosphären (P_0) unterrichtet nachstehende Tab. 6 nach Messungen von H. Röpke.

Tabelle 6.

g% Natriumsalz	Molarität	$-\Delta T$	α	P_0
2,0	0,0170	0,095	1,00	1,13
5,0	0,0422	0,226	0,94	2,69
10,0	0,0844	0,425	0,85	5,04
14,6	0,1233	0,557	0,72	6,64
21,6	0,1825	0,720	0,56	8,56

Eine 14,6%ige Lösung ist isoton mit physiologischer Kochsalzlösung.

Über den Brechungskoeffizienten (bei 21,5° C) unterrichtet folgende Tab. 7:

Tabelle 7.

	g/100 cm³	n_D
freie Säure (Methanol-Lös.)	0,0	1,3278
	0,116	1,3283
	0,263	1,3288
	0,348	1,3292
	0,445	1,3294

In Wasser und Benzol ist II unlöslich, Äthylalkohol löst 0,3%, Methylalkohol 0,8%, Aceton 0,2% und Äther 0,1% bei Zimmertemperatur.

Das neutrale Natriumsalz schmeckt metallisch süßlich mit bitterem Nachgeschmack und ist je nach Vorbehandlung in kaltem Wasser 20—40% löslich und fällt nach langem Erhitzen mehr oder weniger wieder aus. Für die Bestimmung in Harn und Galle wurde die bei I angegebene Methode benutzt, im Blut war die Enteiweißung mit Zinkhydroxyd offenbar wegen starker Absorption an den Nd. nicht anwendbar. Es wurde daher das Blut im Nickeltiegel mit NaOH bei Temperaturen unter 600° verascht und die in Wasser aufgenommene Schmelze anschließend mit Permanganat wie oben oxydiert.

Für die Bestimmung der Abspaltung des Acylrestes wurde diazotiert und mit Rücksicht auf die leichte Fällbarkeit des Farbstoffs bei saurer Reaktion statt mit α-Naphthyläthylendiamin mit α-Naphthol bei alkalischer Reaktion gekuppelt.

Resorption. II wird bei Ratte und Kaninchen nach peroraler Verabreichung schlecht, nach subcutaner Verabreichung gut und ebenso nach Applikation in die Gallenblase und in den Uterus gut resorbiert (vgl. Tab. 10).

Die Verteilung auf die Phasen des Blutes wurde in vitro untersucht (Tab. 8).

Tabelle 8. *Die Verteilung von II auf die Phasen des Hunde- und Menschenblutes in vitro.*

Hund Nr.	mg% Blut	Prozent der Gesamtmenge			Patient Nr.	mg% Blut	Prozent der Gesamtmenge		
		Erythrocyten	Plasma-Eiweiß	Ultra-Filtrat			Erythrocyten	Plasma-Eiweiß	Ultra-Filtrat
1 (41)*	41,7	10,1	—	—	1 (37)*	18,0	—	88,2	13,0
	29,0	0,9	86,7	12,5		11,0	—	78,0	22,0
	22,0	3,0	—	—					
		13,5**							
	16,1	—	—	—	2	38,0	10,5	82,1	7,8
	7,5	—	—	—		19,3	—	86,4	14,8
2 (41)*	38,9	24,1	62,5	13,7	3 (41)*	25,6	7,9	81,9	10,3
	17,5	—	86,0	13,8					
	8,6	—	83,5	19,2					

* Die Zahlen in der Klammer bedeuten Hämatokritwerte zu Beginn des Versuches.

** nach 2 Std.

Ferner wurde an großen Hunden nach Unterbindung der Gallenabflußwege und Exstirpation der Nieren die Verteilung von II nach 20, 50 min, 2, 4, und 8 Std festgestellt (Tab. 9).

Tabelle 9. *Die Verteilung von II beim nierenlosen Hund nach i. v. Verabreichung.*

Hund Nr.	Dosis mg/kg	Zeit Minuten	mg%			Verteilungsvolumen Prozent des Körpergewichts	Liquor mg%
			Blut	Plasma	Ultra-Filtrat		
1 (49)*	97,5	20	41,8	75,0	—	23,8	—
		50	34,8	69,6	—	25,6	—
		120	29,9	51,7	21,4	32,5	—
2 (52)*	97,5	20	40,6	76,8	—	21,2	—
		50	33,7	60,8	—	26,0	—
		120	28,7	62,5	26,0	34,0	0,75
3 (43)*	97,5	50	39,6	61,0	—	18,8	—
		120	25,9	49,6	16,0	37,6	2,05
4 (44)*	97.5	60	33,0	61,4	—	29,0	—
		120	33,0	56,0	—	25,5	—
		240	28,6	64,0	10,2	31,2	—
		480	25,8	44,0	9,0	37,8	—
5 (42)*	97,5	60	29,2	63,1	—	31,2	—
		120	26,0	60,3	—	38,5	—
		240	30,4	54,4	8,4	38,5	—
		480	25,8	52,7	6,8	38,8	1,2
		,,	% des Verabreichten im Dickdarm: 0,001, im Dünndarm: 0,5.				

* Die Zahl in der Klammer bedeutet Hämatokritwert am Ende des Versuches.

Aus den Tabellen ergibt sich, daß II besonders stark an Plasma-Eiweiß gebunden wird. Die geringe Bindung an die Erythrocyten erfolgt rasch, denn sie ändert sich innerhalb 2 Std nicht. Die Verteilung im Körper erfolgt langsamer. Das Gleichgewicht dürfte in 2—4 Std erreicht werden und beträgt 32—39% des Körpergewichts.

Da in einem Verteilungsversuch in vivo nach 8 Std im Dünn- und Dickdarm nur geringfügige Anteile nachweisbar waren, kann eine langsame Ausscheidung durch den Darm als Erklärung für den späten Eintritt des Verteilungsgleichgewichts ausgeschlossen werden, und es ist anzunehmen, daß das große Molargewicht die Verteilung verzögert. — Im Liquor cerebrospinalis wurden als Höchstkonzentration 2 mg% entsprechend einem Plasmaspiegel von 50 mg% gefunden.

Die Ausscheidung von II durch Harn und Galle wird in folgenden Zusammenstellungen wiedergegeben:

Tabelle 10.

Versuchsobjekt	Dosis g/kg	Verabreichungsart	Zeit nach Injektion Stunden	Prozent der Eingabe in Harn	Galle
Ratte	0,41	i. v.	24	29,2	—
„	1,0	subc.	24	57,2	—
„	1,0	p. os	24	1,0	—
Kaninchen	0,72	i. v.			
		(zwei Tiere)	2	— 9,1	26,4 bis 46,0
„			6	— 9,6	53,2 bis 76,0
„			24	11,3 bis 29,0	73,2 bis 88,0
„	0,72	p. os	24	1,1 1,1	1,0 „ 1,2
„	0,1 (in	i. uterin	24	69,5	im Uterus: 1,0
„	0,1 toto)	„	24	36,5	10,6
Hund	0,057	i. v.	2	2,1 bis 8,9	8,7 bis 14,7
			6	2,5 „ 11,7	14,0 „ 24,4
„	28 mg i. d. Gallenbl. bei		2	1,0	5,2
	abgebundenem Duct.		4	2,9	17,0
	cysticus		20	9,8	51,4

Nach intravenöser Verabreichung wird II demnach bei Kaninchen und Hund bevorzugt in der Galle ausgeschieden, in der die Jodkonzentration bis 6% beim Hund und bis 21% beim Kaninchen erreichen kann. Die Konzentrationen steigen bereits in den ersten 5 min an und desgleichen die Clearancewerte (siehe Tab. 11a und 11b).

Nach Verabreichung von 1 g/kg II wurde bei 2 Kaninchen die 6 Std-Galle zur Trockne gebracht, mit schwefelsaurem Methylalkohol von Gallensäuren und -farbstoff befreit. Der Rückstand entsprach etwas unreinem, unverändertem II in 70% der erwarteten Menge.

Bei 13 Patienten wurde nach Gallenblasendarstellung mit II (20 cm³ 20% Lösung des Na-Salzes intravenös) im 24 Std-Harn ein Mittel von 7,6% (3,2—18,4) der Eingabe wiedergefunden.

In 5 von 13 Fällen lag etwa $^1/_5$ der ausgeschiedenen Verbindung als freie Aminoverbindung vor. Ob diese Acylabspaltung auf Einwirkung von Bakterien zurückgeht, ist noch nicht erschöpfend geprüft. Orientierende Versuche mit kolibeimpften 2%igen Natrium-II-Lösungen in Souton-Nährlösung ergaben nach 48 Std keine Acyl- und keine Jodabspaltung. Bei den zahlreichen Ausscheidungsversuchen an Ratte, Kaninchen und Hund konnte nur in einem einzigen Versuch bei der Ratte nach subcutaner Verabreichung im Harn eine Acylabspaltung von 12% nachgewiesen werden.

Zur näheren Beurteilung der Ausscheidung in der Galle wurde nach Infusion von Kreatinin und II beim Hund die Galle mit der Nieren-Clearance verglichen (siehe Tab. 11a und 11b).

Aus den Versuchen 1a und 1b ist zu ersehen, daß bei II-Plasmaspiegeln um 10 mg% bei normaler Kreatininfiltration die II-Galle-Clearance das 7—16fache der II-Nieren-Clearance beträgt, bzw. die Gallespiegel 30—100mal so hoch als die Plasmaspiegel sind, was im Sinne einer aktiven Sekretion durch die Leberzellen zu deuten wäre (CooK)[3], während im Versuch 2 bei hohen II-Plasmaspiegeln die Ausscheidung von II sich annähernd gleichmäßig auf Harn und Galle verteilt. Bei hohen Blutkonzentrationen steigt der nicht an Eiweiß gebundene Anteil. Vielleicht ist das der Grund für die höhere Beteiligung der Niere an der Ausscheidung.

II wird nach alledem rasch und in hoher Konzentration in der Galle ausgeschieden. Außerdem ist es erheblich verträglicher als die neuerdings zur peroralen Cholecystographie empfohlenen Verbindungen.

Tabelle 11a. *(Dauerinfusion.) Die Nieren- und Galle-Clearance von II beim Hund und Kaninchen.*

Versuchs-Nr.		infundiert 0,7 cm³/min Kreatinin % a	b	II mg % a	b	Zeit von bis Minuten	Plasmaspiegel mg% Kreatinin a	b	II a	b	Gallespiegel mg% Kreatinin a	b	II a	b	Clearance Harn Kreatinin a	b	II a	b	Galle Kreatinin a	b	II a	b
Hund 1	a	1,23	1,23	199	80	45— 85	6,88	13,9	8,23	9,1	26,0	77,2	192	390	74,1	39,9	0,256	0,206	0,43	0,19	2,56	1,12
						85—125	8,8	14,8	9,6	10,0	29,5	59,9	234	357	81,4	40,8	0,33	0,200	0,38	0,15	2,88	1,36
						125—165	10,8	15,8	10,9	10,9	37,5	60,8	334	400	76,9	38,2	0,35	0,207	0,37	0,20	3,31	1,94
						165—205	10,8	16,8	11,1	16,0	33,2	46,9	360	443	34,2	35,6	0,16	0,133	0,35	0,14	3,66	1,41
						205—245	10,6	17,5	11,3	20,0	35,8	42,6	450	553	81,6	48,0	0,39	0,200	0,37	0,18	4,38	2,08

Allgemeine Verträglichkeit. LD 50 Ratte: 3,4 g/kg. Tiere, die 1 g/kg i. v. erhalten und am 2., 5. und 9. Tag getötet wurden, zeigten histologisch normale Lebern und Nieren. Je 3 Kaninchen vertrugen 1 und 2 g/kg i. v., 4 g/kg (25% Lösung) bewirkten während der Injektion Muskelzittern und unmittelbar danach Lähmung, die in wenigen Minuten zum Tode führte.

Tabelle 11b. *(Injektion.)*

Versuchs-Nr.	Versuchs-Tier	Dosis mg/kg i. v.	Zeit von bis Minuten	mg% II Plasma-spiegel	mg% II Galle-spiegel	Clearance-II Harn	Clearance-II Galle
2	Hund	500	0— 30	160	1640	6,57	2,84
			30— 60	120	2080	6,2	5,5
			60—120	91	1900	8,55	7,5
			120—240	46	1470	3,34	8,66
3	Hund	100	0— 15	32,2	4180		37,8
			15— 30	27,0	6340		68,6
			30— 60	20,8	5610		72,4
4	Kaninchen	100	0— 15	44,0	21100	5,9	70,5
			15— 30	14,9	1850	18,0	97,0
			30— 60	2,5	915	85,0	134,0

Tabelle 12.

Name	Tier	LwD 50 g/kg Verabreichungsart i. v.	LwD 50 g/kg Verabreichungsart p. os.	Untersucher
3-(3-Amino-2,4,6-trijod-phenyl)2-äthylpro-pionsäure	Ratte	0,39	4,0	eigene Versuche
2-(4-Hydroxy-3,5-dijod-benzyl)-cyclohexan-carbonsäure	Katze	> 0,2	> 0,6—1,8	Wasch[20]
	Ratte	0,39		eigene Versuche
α(4-Hydroxy-3,5-dijod-benzyl)-n-buttersäure	Katze	0,2—0,5	> 1,0	Grayzel[6]
α-(4-Hydroxy-3,5-dijod-benzyl)-n-capronsäure	Katze	< 0,375	> 1,0	Grayzel[6]
Adipinsäure-di-3-car-boxy-2,4,6-trijod-anilid	Ratte	3,4	—	eigene Versuche

Lokale Verträglichkeit. 20%ige Lösung intramuskulär verabreicht (Ratte 0,1 cm³, Kaninchem 0,5 cm³, Hund 0,5 cm³) wurden vertragen. 0,1 cm³ intracutan am Kaninchenohr verursachten keinerlei Reizung, desgleichen am Meerschweinchenbauch. 1 Tropfen 20%ige Lösung ins Kaninchenauge machte keine Reizerscheinungen. 10%ige Lösung (in

physiologischer Kochsalzlösung) bewirkte an Kaninchen-Erythrocyten in 4 Std Hämolyse, 5%ige Lösung nach 24 Std, 2,5% Lösung blieb ohne Einfluß. 1%ige Lösung (in physiologischer Kochsalzlösung) veränderte die osmotische Resistenz von Kaninchen-Erythrocyten nicht.

Für die Frage der Anwendung in der Salpingographie wurden an 3 Kaninchen in ein Uterushorn 0,5 cm³ 20%ige Lösung als Natriumsalz injiziert und in das andere Horn in der gleichen Menge physiologische Kochsalzlösung. Das Horn zeigte histologisch keinerlei pathologische Veränderung.

An der Katze (in Pernocton-Narkose) beeinflußten 60 mg/kg Blutdruck und Atmung nicht. 200 mg kg machten eine geringe Blutdrucksenkung und Abnahme der Atemfrequenz von 16 auf 13 je Minute. 500 mg kg bewirkten einen 5—6 min langen Blutdruckabfall. 1 g/kg senkte den Blutdruck um 40 mm Hg für $^1/_4$ Std. 2 g/kg führten unter starker Blutdrucksenkung zur Atemlähmung.

Am isolierten Herzen nach Straub war erst nach Konzentrationen von 10^{-3} eine geringe Abnahme der Hubhöhe bei unbeeinflußter Schlagfrequenz zu sehen. Am Kaninchen- und Meerschweinchendarm blieben Konzentrationen von 10^{-3} ohne Wirkung. Am Kaninchendünndarm bewirkten Konzentrationen von 10^{-3} bis 5×10^{-3} Kleinerwerden der Pendelbewegungen. 10^{-2} führte zu geringem Tonusanstieg und schwacher Vergrößerung der Pendelbewegungen. Am Meerschweinchendünndarm war 5×10^{-3} wirkungslos und 10^{-2} bewirkte starken Tonusanstieg. In denselben Konzentrationen wurde der durch Barium- bzw. Lentin ausgelöste Spasmus nicht beeinflußt. Am virginellen Meerschweinchenuterus war 2×10^{-3} wirkungslos, 5×10^{-3} rief Tonusanstieg hervor und 10^{-2} starken Tonusanstieg.

An der Ratte verursachten 200 mg/kg i. v. an 3 Tieren eine Steigerung der Galle-Tropfenzahl auf 165, 137 und 200%. Der Höhepunkt der Sekretion lag zwischen der ersten und dritten Stunde.

Hund: 57 mg/kg Steigerung der Galle-Tropfenzahl in 2 Versuchen auf 200 bzw. 500%.

Zusammenfassung.

Das Natriumsalz von Trijod-3-acetaminobenzoesäure (I) ist nach alledem eine nahezu ungiftige Substanz, die peroral kaum, wohl aber parenteral sehr gut resorbiert wird. Es verteilt sich nach i. v. Injektion rasch im Körper, erreicht jedoch nur ein kleines Verteilungsvolumen. I wird mäßig stark von den Plasmaeiweißkörpern adsorbiert, im Stoffwechsel nicht verändert und durch die Niere wahrscheinlich unter Beteiligung von tubulärer Sekretion ausgeschieden.

Das Natriumsalz von Adipinsäure-di-(3-carboxy-2,4,6-trijodanilid) [II] ist eine bei intravenöser Verabreichung gut verträgliche Substanz, die

peroral kaum, wohl aber parenteral gut resorbiert wird. Sie verteilt sich nach intravenöser Verabreichung relativ langsam im Körper und erreicht nur ein kleines Verteilungsvolumen. II wird sehr stark von Plasmaeiweißkörpern adsorbiert, im Stoffwechsel nicht verändert. Ihre rasche und bevorzugte Ausscheidung durch die Galle empfiehlt sie als i. v. Kontrastmittel für die Darstellung der Gallenwege.

Literatur.

[1] Byrne, J. E.: Urologic Rev. **55**, Nr. 4, 193 (1951). — [2] Christensen, W. R., and M. C. Sosman: Amer. J. Roentgenol. **66**, 5, 764 (1951). — [3] Cook, D. L., C. A. Lawler, L. D. Calvin and D. M. Green: Amer. J. Physiol. **171**, 62 (1952). — [4] Everett, E. F., and L. G. Rigler: Radiology **58**, 524 (1952). — [5] Fujita, A., u. D. Iwatake: Biochem. Z. **242**, 43 (1931). — [6] Grayzel, D. M., and S. Natelson: J. Labor. a. clin. Med. **32**, 292 (1947). — [7] Hecht, G.: Handb. exp. Pharm. Erg. Werk 8, Bd. 79 (1939). — [8] Kennedy, Th. J., J. G. Hilton and B. W. Berliner: Amer. J. Physiol. **171**, 164 (1952). — [9a] Langecker, H.: Biochem. Z. im Druck. — [9b] Langecker, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 278, 1953. — [10] Morgan, R. H., and H. B. Stewart: Radiology **58**, 231 (1952). — [11] Nesbit, R. M., and J. Lapides: J. of Urol. **63**, Nr. 6, 1109 (1950). — [12] Neuhaus, D. R.: c. s. J. Labor. a. Clin. Med. **35**, 43 (1950). — [13] Richardson, J. F., and D. K. Rose: J. of Urol. **63**, Nr. 6, 1113 (1950). — [14] Robbins, L. L.: c. s. Radiology **56**, 684 (1951). — [15] Scott, W. G.: J. Missouri Med. Assoc. **48**, 866 (1951). — [16] Shehadi, W. H.: Amer. J. Roentgenol. **68**, 360 (1952). — [17] Somogyi, M. J.: Biol. Chem. **86**, 655 (1930). — [18] Stormont, R. T.: J. Amer. Med. Assoc. **150**, Nr. 8, 795 (1952). — [19] Wallingford, V. H.: c. s. J. Amer. Chem. Soc. **74**, Nr. 17, 4365 (1952). — [20] Wasch, M. G., and B. S. Epstein: Amer. J. Roentgenol. **66**, 1, 98 (1951). — [1] Witzgall, H.: Habilitationsschrift Berlin 1951.

Frau Prof. Dr. Hedwig Langecker, Hauptlaboratorium d. Schering A.G. Berlin-West, Müllerstr. 170—172.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 207—210 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule, Oslo, Norwegen
(Direktor: Professor Dr. Ottar Dybing).

Die Toxizität und Herzwirkung des Scillirosids.

Von
Ottar Dybing.

(Eingegangen am 18. April 1953.)

Rothlin und Schalch (1952) haben kürzlich eingehende Untersuchungen über die Pharmakologie und Toxikologie des Scillirosids und des Scillirosidins veröffentlicht. Im Zusammenhang mit verschiedenen toxikologischen Problemen der roten Meerzwiebel interessierte uns auch die Beziehung der Toxizität des Scillirosids und des Scillirosidins zur Herzwirkung[1]. Einige unserer Resultate können die Versuche von Rothlin und Schalch ergänzen, und sollen unten angeführt werden. Zu unseren Versuchen verwendeten wir Meerschweinchen, weiße Ratten und Mäuse eigener Zucht. Scillirosid und Scillirosidin wurden nach vorherigem Lösen in kleinen Mengen von absolutem Alkohol in wäßrige Lösungen überführt. Die oralen Dosierungen erfolgten mit der Magensonde.

Tabelle 1. *Letale Dosen bei intravenöser Injektion an Meerschweinchen.* Konzentration: 0,01 mg in 1 ml. Injektionsschnelligkeit 0,5 ml pro Minute.

	Scillirosid mg/kg	Scillirosidin mg/kg
	0,158	
	0,168	
	0,186	
	0,224	0,190
	0,213	0,228
	0,227	0,200
	0,193	0,213
	0,248	0,222
Mittelwert. . .	$0{,}202 \pm 0{,}011$	$0{,}211 \pm 0{,}007$

Die hohe Herzwirksamkeit des Scillirosidins konnten wir bestätigen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen an Katzen ist aber Scillirosidin an Meerschweinchen nicht wirksamer als Scillirosid (Tab. 1).

[1] Die Präparate wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Rothlin, A.G. Sandoz, Basel, zur Verfügung gestellt, wofür auch hier gedankt sei.

Auch wir finden indessen Scillirosid und Scillirosidin an der Spitze der herzwirksamen Glykoside, wie aus der Zusammenstellung unserer Werte an Meerschweinchen in Tab. 2 ersichtlich ist.

Tabelle 2. *Intravenös letalen Dosen an Meerschweinchen.*

	mg/kg
Scillirosid	0,20
Scillirosidin	0,21
Scillaren	0,63
Lanatosid C	0,82
g-Strophanthin	0,28
k-Strophanthin	0,58
k-Strophanthosid	0,64

Die Toxizität des Scillirosids und des Scillirosidins an Ratten bei peroraler Darreichung wurde mit annähernd denselben Werten wie in den Versuchen von Rothlin und Schalch bestimmt. Unsere Ratten scheinen vielleicht etwas resistenter zu sein mit LD 50 bei 2,3 mg/kg Scillirosid für männliche Ratten und 0,7 mg/kg Scillirosidin für weibliche Ratten. Mit den kleinen Stoffmengen, die wir zur Verfü ung hatten, war es schwer, einen Unterschied zwischen Scillirosid und Scillirosidin bezüglich der toxischen Wirkung an Ratten festzustellen. An Mäusen aber war der Unterschied sehr deutlich. Die letalen Dosen von Scillirosid wurden schon früher an weißen Mäusen (113 Männchen) mit LD 50 (oral) bei 0,440 ± 0,014 mg/kg bestimmt (Dybing, Dybing u. Stormorken 1952). Für Scillirosidin fanden wir LD 50 bei 0,15 mg/kg (49 Männchen). Scillirosidin ist somit etwa 3mal mehr toxisch als Scillirosid an der Maus.

Es ist in verschiedenen Veröffentlichungen eingehend erörtert worden, ob die toxische Wirkung der roten Meerzwiebel auf Ratten in Zusammenhang mit der Herzwirkung stehe, oder ob die Giftwirkung mit ihren charakteristischen Krämpfen eine besondere Eigenschaft des Scillirosids darstelle. Rothlin und Schalch ziehen aus der hemmenden Wirkung einer Hydantoin-Verbindung auf die Krampf- und Toxizitätswirkung des Scillirosids den Schluß, daß es sich um eine zentral-nervöse Wirkung handelt. Auch wir glauben, daß die Giftwirkung des Scillirosids nicht in erster Linie mit der Herzwirksamkeit in Verbindung steht. So finden wir bei langsamer intravenöser Injektion des Scillirosids bis zum Herzstillstand an Ratten eine relativ hohe Resistenz (Tab. 3). In diesen Versuchen wurden nicht Scillirosid Sandoz, sondern ein amorphes Scillirosidpräparat aus roter Meerzwiebel, von uns nach der Methode von Stoll und Renz (1941) hergestellt, benutzt, mit LD 50 (oral) an Ratten (Gew. 100 bis 150 g) bei 2,6 mg/kg (Männchen) und 1,1 mg/kg (Weibchen).

Es ist bemerkenswert, daß bei dieser intravenös herzlähmenden Dosis des Scillirosids kein Unterschied zwischen den Geschlechtern vorliegt. Die Streuung ist zwar groß, aber man erkennt deutlich, daß die herzlähmenden Dosen viel höher liegen als die peroral letalen. Wir führten

auch einige Versuche mit der halben Konzentration (0,1 mg/ml) aus. Dabei waren aber die herzlähmenden Dosen noch höher, etwa 10 mg/kg sowohl an Männchen sowie an Weibchen. Höhere Scillirosidkonzentrationen wurden nicht versucht, da die Dauer der Injektion schon bei 0,2 mg/ml nur etwa 10 min war.

Tabelle 3. *Letale Dosen bei langsamer Injektion von Scillirosid an Ratten.* Konzentration: 0,2 mg/ml. Injektionsschnelligkeit 0,5 ml pro Minute.

Gewicht g	Männchen		Gewicht g	Weibchen	
	ml	mg/kg		ml	mg/kg
172	4,48	5,21	167	4,35	5,21
171	4,61	5,39	188	4,22	4,49
200	6,40	6,40	190	3,71	3,91
175	4,10	4,69	184	7,80	8,49
182	5,12	5,63	152	3,20	4,21
200	7,04	7,04	167	3,71	4,44
198	3,84	3,88	193	7,04	7,30
Mittelwert		5,46 ± 0,40			5,44 ± 0,67

Die wohlbekannte hohe Resistenz des Rattenherzen gegenüber herzwirksamer Digitalisstoffen gilt also auch für die Herzwirksamkeit des Scillirosids. Die Ratten können deshalb während einer Scillirosidvergiftung nicht an akuter Herzlähmung sterben, da die zum Herzstillstand erforderlichen Blutkonzentrationen bei den üblichen peroral toxischen Dosen nicht erreicht werden können. Bemerkungswert ist auch die Tatsache, daß die herzlähmende Wirkung des Scillirosids eine schnelle Zufuhr des Glykosids voraussetzt; wenn die Injektionsschnelligkeit auf die Hälfte herabgesetzt wird, müssen die für Herzlähmung erforderlichen Dosen bis etwa um das Doppelte erhöht werden. Diese schnelle Inaktivierung der herztoxischen Wirkung steht im deutlichen Gegensatz zu der Latenzzeit für die konvulsive Wirkung des Scillirosids.

Diese Ergebnisse stützen die Auffassung, daß die rattozide Wirkung des Scillirosids eine unter den Digitalisglykosiden spezifische Wirkung darstellt. Auf der anderen Seite kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Herzwirksamkeit des Scillirosids ein gewisser Anteil an der Toxizität zuzuschreiben ist. In dieser Richtung deutet unsere Beobachtung eines Antagonismus zwischen roter Meerzwiebel und calciumbindenden Stoffen (Natriumsiliciumfluorid, Citronensäure und Oxalsäure) hinsichtlich der toxischen Wirkung (Dybing, Dybing u. Stormorken 1952).

Zusammenfassung.

Die herzlähmenden Dosen des Scillirosids und des Scillirosidins betrugen an Meerschweinchen bzw. 0,20 und 0,21 mg/kg; diese Verbindungen stehen somit an der Spitze der herzwirksamen Digitalisstoffe.

Für Scillirosidin wurde eine deutlich höhere orale Toxizität gegenüber Scillirosid besonders an Mäusen beobachtet (0,15 mg/kg gegen 0,44 mg/kg).

An Ratten war die herzlähmende Dosis des Scillirosids bei langsamer intravenöser Injektion etwa 5 mg/kg ohne Geschlechtsdifferenz, die letalen Dosen bei oraler Zufuhr waren für dasselbe Scillirosidpräparat 2,6 mg/kg an männlichen und 1,1 mg/kg an weiblichen Ratten. Die relativ hohe Resistenz der Ratten gegenüber der herzlähmenden Wirkung des Scillirosids stützt die Auffassung, daß die rattozide Wirkung des Scillirosids nicht in erster Linie eine Herzwirkung ist.

Literatur.

Dybing, F., O. Dybing u. H. Stormorken: Acta pharmac. tox., K'hvn. **8**, 391 (1952). — Rothlin, E., u. W. R. Schalch: Helvet. Physiol. Acta, **10**, 427 (1952). — Stoll, A., u. J. Renz: Helvet. Chim. Acta, **25**, 43 (1941).

Prof. Dr. Ottar Dybing, Pharmakol. Inst. der Tierärztl. Hochschule Oslo/Norw.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 211—218 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Holtz).

Die Wirkung der Piqûre auf den Hormongehalt und die hormonale Zusammensetzung des Nebennierenmarks.

Von
Albrecht Engelhardt und Kurt Greeff.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. April 1953.)

In früheren Arbeiten des Instituts wurden Beweise dafür erbracht, daß an der Zusammensetzung des Nebennierenmarkinkretes der meisten Tierarten und des Menschen neben Adrenalin die noch nicht methylierte Vorstufe Nor-adrenalin oder Arterenol beteiligt ist und wie ein echtes Hormon von der Inkretdrüse ans Blut abgegeben werden kann. Es hatte sich ergeben, daß Nebennierenextrakte von Rind, Schwein, Hund, Katze, Maus, Frosch und auch solche vom Menschen neben Adrenalin 20—50% Arterenol enthalten, während im Gegensatz hierzu in Extrakten von Kaninchen-, Meerschweinchen- und Rattennebennieren kein Arterenol oder allenfalls nur Spuren nachgewiesen werden konnten. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns die Frage vorgelegt, ob während einer länger dauernden sekretorischen Beanspruchung der Nebenniere auch bei solchen Tierarten Arterenol im Nebennierenmark auftritt, die normalerweise nur Adrenalin enthalten.

Durch den Zuckerstich Claude Bernards, eine mechanische Läsion des in der Rautengrube gelegenen Zuckerzentrums ist die Möglichkeit gegeben, experimentell eine über mehrere Stunden anhaltende Hormonausschüttung aus den Nebennieren auszulösen, die zu einer Hormonverarmung und zu einer Abnahme der Chromierbarkeit der Markzellen (Kahn, Trendelenburg) führt. Die Hormonausschüttung erfolgt nervös auf dem Wege über die Nervi splanchnici.

Mit einer ähnlichen Fragestellung wurden in der letzten Zeit von anderen Autoren Versuche mit Insulin durchgeführt — von Burn, Hutcheon und Parker, sowie von Outschoorn an Ratten, von Hökfelt an Ratten und Kaninchen und von West an Kaninchen. Der Reiz für die Hormonausschüttung erfolgt bei der Piqûre direkt durch eine mechanische Läsion des Zuckerzentrums, bei der Insulinbehandlung indirekt durch Senkung des Blutzuckerspiegels und dadurch bedingte Stimulierung sympathischer hypothalamischer Zentren; im ersten Fall tritt eine Hyperglykämie ein, im letzteren eine Hypoglykämie.

Wir haben die Piqûre durchgeführt bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten und haben vergleichsweise Insulinbehandlungen angestellt bei Meerschweinchen, Ratten und Mäusen.

Methodik.

a) *Piqûre.* Der Zuckerstich wurde bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten nach der von A. Jarisch angegebenen Technik ausgeführt: Nach Spaltung der Nackenmuskulatur und der Membrana atlantooccipitalis wird in starker Anteflexion des Kopfes ein feines Zahnhäkchen je nach Tierart 4—10 mm tief in den 4. Ventrikel eingeführt und auf jeder Seite — bei Kaninchen 2—3 mm, bei Meerschweinchen 1 mm von der Mittellinie entfernt — in den Boden des 4. Ventrikels eingestochen. Der Eingriff wurde bei Ratten und Meerschweinchen in flacher Äthernarkose, bei Kaninchen in Lokalanästhesie mit einem zusätzlichen Ätherrausch für den Einstich selbst ausgeführt. Narkose und operative Manipulation ohne Läsion der Rautengrube sind, wie Kontrollversuche an Meerschweinchen mit stündlichen Blutuntersuchungen und Austestung der Nebennieren 3 und 6 Std nach dem Eingriff ergaben, ohne Einfluß auf Blutzucker und Hormongehalt. Die richtige anatomische Lage des Einstichs in der Rautengrube kontrollierten wir in jedem Falle autoptisch; von der Wirksamkeit der Piqûre überzeugten wir uns durch Blutzuckerbestimmungen, die nach der Methode von Hagedorn-Jensen ausgeführt wurden. Die Blutentnahme erfolgte bei Kaninchen in 1-stündigem Abstand aus der Ohrvene, bei Ratten und Meerschweinchen am Ende des Versuchs oder bei längerer Versuchsdauer alle 2 Std nach der Operation durch Herzpunktion.

b) *Insulin.* Insulinversuche wurden an Meerschweinchen, Ratten und Mäusen ausgeführt. Wir verwandten Degewop-Insulin der Firma Schering und verdünnten so, daß Ratten und Meerschweinchen 0,5 cm^3 und Mäuse 0,3 cm^3 subcutan erhielten. Die in Vorversuchen ermittelte Dosierung, die mit Sicherheit hypoglykämische Krämpfe verursachte und auch ohne Glucoseverabfolgung nicht tödlich wirkte, betrug für Meerschweinchen 1 E/100 g, Mäuse 1,5 E/100 g, Ratten 2,5 E/100 g.

c) *Aufarbeitung und Bestimmung des Hormongehaltes der Nebennieren.* Die Nebennieren wurden nach Frowein (Extraktion mit Salzsäure-Acetatpuffer) aufgearbeitet. Die Austestung der klaren Extrakte erfolgte wie in früheren Arbeiten des Instituts 1. am Blutdruck der Katze, 2. am Rattenuterus nach der von de Jalon oder der von King angegebenen Versuchsanordnung und 3. am Kückenrectum bzw. Hühner-caecum (Euler). An dem ersten Testobjekt ist Arterenol 2—5mal wirksamer, am zweiten und dritten Testobjekt ist es 20—100fach weniger wirksam als Adrenalin.

Versuche.

1. Kaninchen. Das Ergebnis der Kaninchenversuche ist in der Abb. 1 kurvenmäßig dargestellt. Die Kurven entsprechen den Mittelwerten von je drei Versuchstieren. Die eine Gruppe diente als Kontrolle, die zweite Gruppe wurde 3 Std, die dritte Gruppe 6 Std nach der Piqûre getötet. Da die Nebennierengewichte bei Kaninchen sehr große Schwankungen aufweisen, wurde der Adrenalingehalt nicht auf das Nebennieren-, sondern auf das Körpergewicht bezogen.

Die Piqûre verursachte eine starke Adrenalinverarmung der Nebennieren; nach 3 Std ist der Adrenalingehalt von 74 γ/kg auf 25 γ/kg abgesunken. Von da an scheint die Hormonsynthese die Hormonabgabe zu übertreffen, so daß es zu einem Wiederanstieg des Adrenalingehaltes kommt, der nach 6 Std 44 γ/kg beträgt. Spiegelbildlich zur Kurve des Hormongehaltes verläuft die Blutzuckerkurve. Bemerkenswert ist, daß trotz der erheblichen Hormonverarmung des Nebennierenmarks auf $^1/_3$

des ursprünglichen Gehaltes Noradrenalin (Arterenol) nicht in nachweisbaren Mengen auftrat. — Bei einem Versuchstier, bei dem die Piqûre eine besonders langdauernde Wirkung hatte, betrug der Blutzuckerwert noch nach 6 Std 330 mg%, der Adrenalingehalt der Nebennieren nur 19 γ/kg; trotzdem fand sich auch in diesem Fall kein Arterenol. In den Versuchen von West mit Insulinbelastung kam es bei Kaninchen vor dem Absinken zu einer Zunahme des Adrenalingehaltes während der ersten zwei Versuchsstunden. Ein primärer Anstieg des Hormongehaltes wäre uns

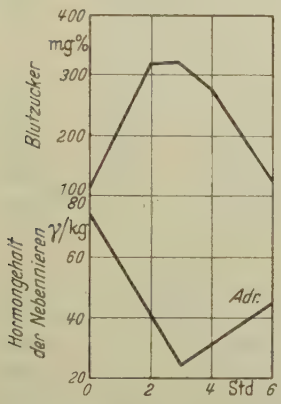


Abb. 1. Einfluß der Piqûre auf Blutzucker und Adrenalingehalt der Kaninchen-Nebenniere.

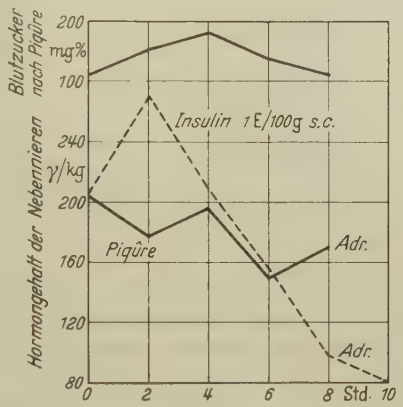


Abb. 2. Einfluß von Piqûre und Insulin auf den Hormongehalt des Nebennierenmarks von Meerschweinchen. Blutzucker nach Piqûre.

entgangen, da in unseren Versuchen die Tötung der Tiere frühestens nach 3 Std erfolgte.

2. Meerschweinchen. Die Wirkung des Zuckerstichs war bei Meerschweinchen weit schwächer als bei Kaninchen; der Blutzuckeranstieg erfolgte sehr protrahiert und erreichte erst nach 4 Std den Höchstwert. Dementsprechend nahm der Adrenalingehalt der Nebennieren im Verlauf von 6 Std nur um ungefähr 25% des Ausgangswertes ab — von 205 auf 150 γ/kg.

In Vergleichsversuchen mit hohen Insulindosen (1 E/100 g) fanden wir ähnlich wie West bei Kaninchen einen deutlichen primären Anstieg des Hormongehaltes, der nach 2 Std sein Maximum erreichte. Von der 4. Std an sank der Adrenalingehalt dann kontinuierlich über 10 Std ab — von 205 auf 82 γ/kg. — Weder in den Piqûre-, noch in den Insulinversuchen war Arterenol zu irgend einem Zeitpunkt nachweisbar.

Die Tab. 1 gibt eine Übersicht über die einzelnen Versuche und enthält Angaben über die Körper- und Nebennierengewichte sowie über die ermittelten Adrenalinmengen, bezogen auf 1 g Nebenniere bzw. 1 kg

Körpergewicht. Auch bei den Meerschweinchen waren die Gewichte der Nebennieren wohl wegen der individuell sehr unterschiedlichen Entwicklung der Rinde sehr verschieden.

Tabelle 1. *Adrenalingehalt der Meerschweinchen-Nebenniere (NN) nach Piqûre und Insulin.*

Lfd. Nr.		Geschlecht Gewicht g	NN Gewicht mg	Adrenalingehalt der NN pro g Nebenniere γ	pro kg Körpergewicht γ
1		♂ 380	225	351	208
2	Normaltiere	♀ 250	131	378	198
3		♂ 600	460	272	208
4	2 Std nach Piqûre	♀ 510	270	353	187
5		♂ 440	190	385	166
6	4 Std nach Piqûre	♂ 520	322	310	192
7		♀ 480	335	286	200
8	6 Std nach Piqûre	♀ 520	410	183	144
9		♂ 480	245	306	156
10	8 Std nach Piqûre	♂ 510	310	266	162
11		♀ 470	255	330	179
12	2 Std nach 1 E/100 g Insulin	♀ 570	410	335	241
13		♀ 570	245	693	298
14		♀ 380	220	448	259
15	4 Std nach 1 E/100 g Insulin	♂ 460	335	178	129
16		♀ 490	290	397	235
17	6 Std nach 1 E/100 g Insulin	♀ 480	285	231	137
18		♀ 480	320	246	164
19		♀ 340	280	118	97
20	8 Std nach 1 E/100 g Insulin	♀ 490	360	118	87
21		♀ 410	270	177	117
22	10 Std nach 1 E/100 g Insulin	♂ 620	555	91	81
23		♂ 720	630	95	83

3. Ratten. Die Piqûre hatte sowohl auf Blutzucker als Hormongehalt der Nebennieren eine deutliche Wirkung (Abb. 3). Synchron mit dem Anstieg des Blutzuckers nimmt der Adrenalingehalt der Nebennieren ab; nach 6 Std hat der Blutzuckergehalt den Höhepunkt, der Adrenalingehalt den Tiefpunkt erreicht (siehe auch Tab. 2).

Das bemerkenswerteste Ergebnis ist, daß im Gegensatz zu Kaninchen und Meerschweinchen bei der Ratte die starke und langdauernde sekretorische Beanspruchung der Nebennieren zum Auftreten von Arterenol führt. Die während der ersten 4 Std erfolgende Abgabe von Adrenalin scheint durch die Neubildung von Arterenol kompensiert zu werden, so daß der Gesamthormongehalt während dieser Zeit praktisch unverändert bleibt.

Tabelle 2. *Der Einfluß der Piqûre auf den Hormongehalt der Ratten-Nebenniere.*

Lfd. Nr.		Geschlecht Gewicht g	Hormongehalt der NN pro kg Körpergewicht			Arterenol Anteil %
			Adr γ	Art γ	Insgesamt γ	
1	Normaltiere	250	226	—	226	—
2		300	214	—	214	—
3		170	234	—	234	—
4		190	213	—	213	—
5	2 Std nach Piqûre	230	185	16	201	8
6		160	200	26	226	11
7	4 Std nach Piqûre	222	148	73	221	33
8		300	157	58	215	27
9	6 Std nach Piqûre	214	83	19	102	19
10		240	101	16	117	15
11	8 Std nach Piqûre	138	160	29	189	15
12		180	148	26	174	15

Von der 4. Std ab ist dies offenbar nicht mehr der Fall, so daß es jetzt zu einer Abnahme des Gesamthormongehaltes kommt. Das unter dem Sekretionsreiz neugebildete Arterenol verschwindet allmählich wieder, indem es zu Adrenalin methyliert oder vielleicht auch als solches zusammen mit Adrenalin sezerniert wird.

Eine vergleichsweise mit Insulin (2,5 E/100 g s. c.) durchgeführte Versuchsreihe ergab prinzipiell gleiche Ergebnisse wie die Piqûreversuche. Bis 8 Std nach der Injektion trat zunehmend eine Adrenalinverarmung ein; im Höchstfall um 70%. Gleichzeitig konnte wiederum Arterenol bis zu 50% des Gesamthormongehaltes nachgewiesen werden.

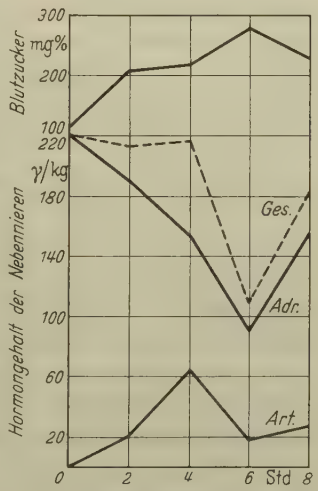


Abb. 3. Einfluß der Piqûre auf Blutzucker und Hormongehalt der Rattennebenniere. *Ges.* Gesamthormongehalt; *Adr* Adrenalin; *Art* Arterenol.

4. Mäuse. Es erschien von Interesse, Versuche an einer Tierart zu machen, in deren Nebennierenmark schon normalerweise neben Adrenalin auch Arterenol vorkommt. Untersuchungen von Schümann und Trabitzsch hatten ergeben, daß Mäusenebennieren ungefähr 25% Arterenol enthalten. Der absolute Hormongehalt variiert außerordentlich stark und hängt u. a. von der Umgebungstemperatur ab. Die Tiere wurden deshalb schon zwei Tage vor dem

Versuch und während der ganzen Versuchsdauer im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 25° C gehalten.

Die Abb. 4 zeigt die an je zwei Gruppen von 4 Tieren erhaltenen Ergebnisse von Versuchen mit Insulinbelastung. Ähnlich wie in den Piqûreversuchen an Ratten kommt es bei Mäusen unter der Wirkung der hier durch Insulin ausgelösten Hormonsekretion zu einer deutlichen Anregung der Arterenolbildung, die allerdings nicht Schritt hält mit der Adrenalinabgabe, so daß von Anfang an auch der Gesamthormongehalt abnimmt.

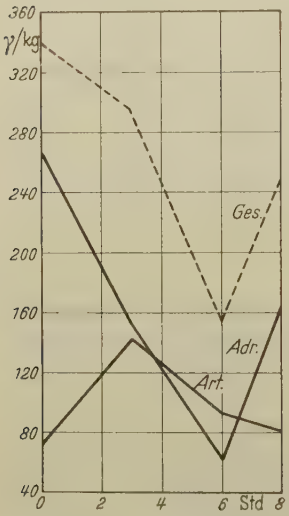


Abb. 4. Hormongehalt des Nebennierenmarks von Mäusen nach Insulin (1,5 E/100 g). *Ges.* Gesamthormongehalt; *Adr* Adrenalin; *Art* Arterenol.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Piqûre sowohl als die Belastung mit hohen Insulindosen führte bei allen untersuchten Tierarten zu einer starken Abnahme des Adrenalingehaltes im Nebennierenmark. Wie andere Autoren bei Kaninchen, so fanden wir bei Meerschweinchen nach Insulin, daß es in den ersten beiden Stunden zu einem *Anstieg* der Adrenalinwerte kommt, an den sich dann erst die *Abnahme* des Hormongehaltes anschließt. Der starke Sekretionsreiz veranlaßt die Drüse also zu einer überschießenden, d. h. die Hormon*sekretion* zunächst übersteigenden Hormon*produktion*. Trotz schließlich starker Hormonverarmung der Nebennieren trat Arterenol bei Kaninchen und Meerschweinchen nicht in nachweisbaren Mengen auf.

Auch bei Ratten und Mäusen regt der auf die Nebennieren ausgeübte Sekretionsreiz die Wirkstoffsynthese an, was bei diesen Tierarten aber nicht in einer vorübergehenden Zunahme des Gesamthormongehaltes, sondern nur in einer vermehrten Neubildung von Arterenol zum Ausdruck kommt, die unter unseren Versuchsbedingungen bei Ratten gerade ausreichte, um die Adrenalinausschüttung eine Zeit lang zu kompensieren, so daß der Gesamthormongehalt während der ersten beiden Stunden fast konstant blieb, bei Mäusen jedoch ein sofort einsetzendes Absinken des Hormongehaltes nicht verhindern konnte. Bei Ratten und Mäusen ist die Methylierungsfähigkeit offenbar schwächer als bei Meerschweinchen und Kaninchen, so daß die *Bildung* von Arterenol schneller erfolgt als seine *Methylierung* zu Adrenalin.

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob das nach der Piqûre oder Insulininjektion bei Ratten und Mäusen im Nebennierenmark vermehrt

auftretende Nor-Adrenalin nach einiger Zeit nur deshalb wieder abnimmt, weil es zu Adrenalin *methyliert* wird, — oder auch deshalb, weil es zusammen mit Adrenalin *sezerniert* wird. In einer früheren Arbeit (Holtz, Engelhardt, Greef und Schümann [1952]), in der bei Katzen die Nebennieren durch elektrische Splanchnicusreizung zur Hormonsekretion veranlaßt wurden, konnten wir zeigen, daß unter normalen Bedingungen unabhängig von dem hormonalen Mischungsverhältnis in der Inkretdrüse ganz überwiegend — mehr als 90% — Adrenalin abgegeben wird. Weitere Untersuchungen ergaben sodann (Holtz, Engelhardt und Greef), daß bei schnell aufeinanderfolgenden bzw. langdauernden Splanchnicusreizungen das abgegebene Nebennierenmarkinkret beträchtliche Mengen Noradrenalin enthalten kann. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß auch in den Ratten- und Mäuseversuchen unter dem langanhaltenden Sekretionsreiz — Piqûre, Insulin — Noradrenalin sezerniert wird. Andererseits sinkt bei Mäusen der Noradrenalingehalt des Nebennierenmarks nicht unter das ursprüngliche Niveau ab. Das könnte dafür sprechen, daß nur das unter der Reizwirkung neugebildete Noradrenalin sezerniert werden kann, nicht aber das ursprünglich in der Drüse vorhandene.

Zusammenfassung.

1. Die Piqûre verursacht bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten, deren Nebennierenmark normalerweise nur Adrenalin enthält, eine starke Verarmung der Nebennieren an Adrenalin. Im Gegensatz zu Kaninchen und Meerschweinchen wird bei Ratten im Anschluß an die Piqû·e Noradrenalin nachweisbar. Das Nebennierenmark kann dann bis zu 50% Noradrenalin enthalten.

2. Auch nach hohen Insulindosen, die zu einer erheblichen Hormonverarmung der Nebennieren führen, treten bei Meerschweinchen keine nachweisbaren Noradrenalinmengen auf. Bei Mäusen hingegen nimmt der schon normalerweise vorhandene Noradrenalingehalt des Nebennierenmarks nach Insulin zu, so daß zeitweise mehr Noradrenalin als Adrenalin vorhanden ist.

3. Die Versuchsergebnisse weisen darauf hin, daß die Methylierungsfähigkeit des Nebennierenmarks bei Kaninchen und Meerschweinchen größer ist als bei Ratten und Mäusen.

Literatur.

Burn, J. H., D. E. Hutcheon and R. H. O. Parker: J. Pharmacol. and Chemotherap. **5**, 417 (1950). — Euler, U. S. v.: Acta Physiol. scand. **19**, 207 (1949). — Frowein, B.: Biochem. Z. **134**, 558 (1923). — Hökfelt, B.: Acta Physiol. scand. **25**, Suppl. 92 (1951). — Holtz, P.: Pharmazie Berlin, **5**, 49 (1950). — Acta

neuroveget., Wien **4**, 276 (1952). — Holtz, P., A. Engelhardt, K. Greeff u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 150 (1952). — Holtz, P., A. Engelhardt u. K. Greeff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (in Vorbereitung). — de Jalon, P. G., J. B. Bayo and M. H. de Jalon: Farmacoterap. actual. **2**, 313 (1945). — Jarisch, A.: Pflügers Arch. **158**, 478 (1914). — Kahn, R. H.: Pflügers Arch. **146**, 378 (1912). — King, R.: J. of Physiol. **109**, 30 (1949). — Outschoorn, A. S.: Nature (Lond.) **167**, 722 (1951). — Schümann, H. J., D. Trabitzsch u. R. Ewert: Arch. internat. Pharmacodynamie **87**, 212 (1951). — Trendelenburg, P.: Pflügers Arch. **201**, 39 (1923). — West, G. B.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 289 (1951).

Dr. Albrecht Engelhardt, Pharmakol. Inst. der Universität Rostock.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 219—224 (1953).

Aus der Universitäts-Frauenklinik Münster i. W.
(Direktorat: Prof. Dr. W. Bickenbach)*.

Der Einfluß von Frauenharn und Follikelhormon auf den Bewegungstrieb infantiler weiblicher weißer Mäuse.

Von
Otto Nacke und Jürgen Steinmann.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. April 1953.)

Den Anstoß zu dieser Arbeit gab die Beobachtung, daß beim Aschheim-Zondek-Test zwischen den positiven und den negativen Tieren ein Unterschied in der Verhaltensweise besteht, der so eindrucksvoll ist, daß häufig allein auf Grund dieser Beobachtung der Ausgang des Versuchs vorausgesagt werden kann. Dieses Phänomen sollte durch exakte Messungen nachgeprüft und außerdem sollte versucht werden, Aufschlüsse über die Art der hier wirkenden Stoffe zu erhalten.

Nach dem heutigen Stand des Wissens ist anzunehmen, daß diese Beeinflussung des Verhaltens der Tiere durch hormonale Wirkstoffe verursacht wird. Hierüber ist bisher folgendes bekannt:

Die Spontanaktivität weiblicher weißer Ratten ist von Slonaker 1924 untersucht worden. Er stellte bei den in selbständig registrierenden Drehkäfigen gehaltenen Tieren fest, daß der Bewegungstrieb in der Pubertät stark ansteigt und während der Geschlechtsreife rhythmische Schwankungen aufweist, die dem Östruszyklus parallel laufen. Das Maximum der Lauftätigkeit war während des Östrus beobachtet worden. In der Menopause sank die Spontanaktivität wieder ab, und die zyklischen Schwankungen hörten auf. Bei trächtigen Tieren beobachtete Slonaker 1927, daß der Bewegungstrieb von der Konzeption bis zum Ende der Laktationsperiode sehr gering war.

Bei geschlechtsreifen Frauen ist die motorische Aktivität im Postmenstrum groß und nimmt bis zum Ende der folgenden Regelblutung laufend ab. Billings konnte diesen Befund an genitalgesunden Anstaltsinsassinnen erheben, denen er unbemerkt einen Schrittzähler in der Kleidung anbrachte.

Der Einfluß von Follikelflüssigkeit aus Schweineovarien auf die Aktivität kastrierter weiblicher Ratten ist von Bugbee und Simond untersucht worden. Sie konnten zwar eine Aktivitätssteigerung der durch die Kastration sehr trägen Tiere erreichen, fanden aber keine eindeutige Abhängigkeit des Effektes von der verabfolgten Dosis, da bei den Tieren nach Verabfolgung von 48 Ratteneinheiten der Bewegungstrieb größer war als nach 144 Ratteneinheiten. Diesem Befund wider-

* Die vorliegende Arbeit wurde bereits 1949 unter dem Direktorat von Herrn Professor Bickenbach beendet, konnte aber aus äußeren Gründen erst jetzt veröffentlicht werden.

sprechen die Beobachtungen von Slonaker, der senilen kastrierten Ratten Follikelflüssigkeit injiziert und damit eine Herabsetzung der Spontanaktivität erreicht hat.

Der Einfluß von Follikelhormonpräparaten auf die Aktivität infantiler Tiere ist unseres Wissens bisher noch nicht untersucht worden.

Versuche mit Harn schwangerer und nicht schwangerer Frauen.

Methode.

Infantile weibliche weiße Mäuse erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen je zwei Injektionen von 0,3 cm³ Urin unter die Rückenhaut. Die Lauftätigkeit der Tiere wurde mit dem Kipptellerapparat von Forst täglich 1½ Std lang gemessen. Das Ergebnis der Messungen vor Beginn der Injektionen stellt den Normalwert dar. Die Abweichungen der Meßwerte während der Injektionstage vom Normalwert sind in Prozenten des Normalwertes ausgedrückt worden.

Insgesamt wurden 4 Versuchsgruppen untersucht. Aus den Meßwerten jeder Gruppe wurde der Mittelwert und der dreifache mittlere Fehler berechnet.

Die Standardabweichung σ wurde nach der Formel $\sigma = \pm \sqrt{\frac{d^2}{n-1}}$ errechnet. Dabei bedeuten d die Differenz der Einzelmessungen vom Mittelwert und n die Anzahl der Messungen.

Der dreifache mittlere Fehler des Mittelwertes $3\,f_m$ beträgt dann:

$$3\,f_m = \pm 3\,\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Ergebnisse.

Versuchsgruppe I: 9 Tieren wurde der *unbehandelte* Urin von nichtschwangeren Frauen injiziert. Das Verhalten der Tiere änderte sich nach der Injektion erheblich. Die Bewegungen der Tiere erfolgten hastig und das Laufen wurde häufig von schnell aufeinanderfolgenden Sprüngen unterbrochen. Die Zunahme der Meßwerte für die Lauftätigkeit betrug am 1. Tag + 44,9%, am 2. Tag + 70,39% und am 3. Tag + 162,2%. Da die Differenz des Mittelwertes vom 1. Tag gegenüber dem Ausgangs-Mittelwert statistisch gesichert werden konnte, ist die Steigerung der Aktivität infantiler weiblicher Mäuse nach Injektion von unbehandeltem Harn nicht-schwangerer Frauen auf Grund unserer Ergebnisse als signifikant zu bezeichnen (siehe Abb. 1).

Versuchsgruppe II: 10 Mäusen wurde unbehandelter Urin schwangerer Frauen injiziert. Die Lauftätigkeit der Tiere sank darauf im Mittelwert am 1. Tag um — 27,3%, am 2. Tag um — 49,6% und am 3. Tag um — 34,9% ab. An allen drei Injektionstagen lagen die Meßwerte außerhalb des dreifachen mittleren Fehlers und waren damit statistisch gesichert (siehe Abb. 2).

Die in den beiden ersten Versuchsgruppen gewonnenen Ergebnisse gaben Veranlassung zu weiteren Versuchen, die zum Ziele hatten, die im Harn vorhandenen wirksamen Stoffe auf ihre Löslichkeit zu untersuchen, um so eine gewisse grobe Eingruppierung vornehmen zu können.

Versuchsgruppe III: 11 Tieren wurde Urin von nicht-schwangeren Frauen injiziert, der vorher mit Äther ausgeschüttelt worden war. Die Steigerung der Aktivität, wie sie in der Versuchsgruppe I beobachtet worden ist, trat jetzt nicht mehr auf. Die Meßwerte der Lauftätigkeit

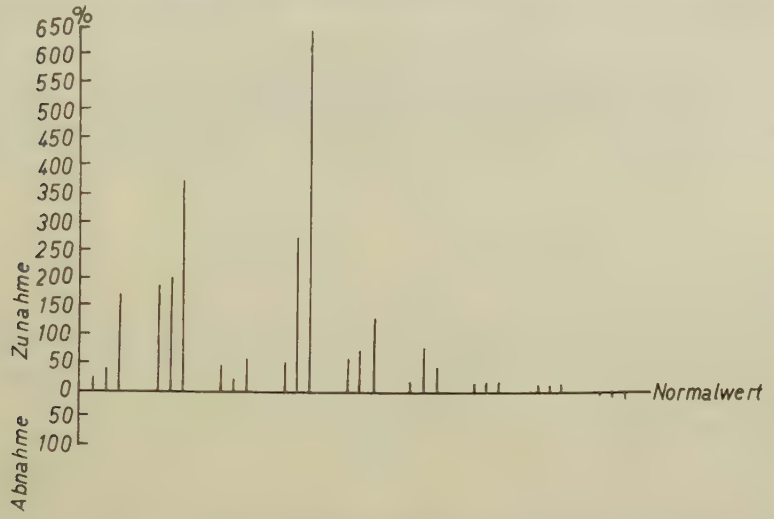


Abb. 1. Steigerung der Lauftätigkeit 9 infantiler weiblicher Mäuse durch Injektionen von Urin nicht-schwangerer Frauen. Je drei zusammenliegende Säulen bezeichnen die Änderung der Lauftätigkeit eines Tieres an den drei Injektionstagen gegenüber dem Wert vor der Behandlung.

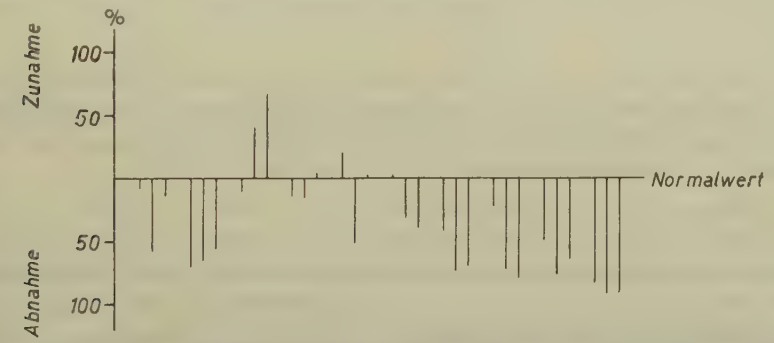


Abb. 2. Senkung der Lauftätigkeit 10 infantiler weiblicher Mäuse durch Injektionen von Urin schwangerer Frauen. Je drei zusammenliegende Säulen bezeichnen die Änderung der Lauftätigkeit eines Tieres an den drei Injektionstagen gegenüber dem Wert vor der Behandlung.

wichen am 1. Tag mit + 9,6%, am 2. Tag mit — 2,3% und am 3. Tag mit — 1,6% nur unwesentlich vom Ausgangswert ab. Die Mittelwerte lagen an allen drei Injektionstagen innerhalb des Streuungsbereiches. Diese Ergebnisse zeigen also, daß die Injektion von Harn nicht-schwangerer Frauen nach dem Ausschütteln mit Äther keinen Einfluß auf die motorische Aktivität infantiler weiblicher Mäuse mehr hat (siehe Abb. 3).

Versuchsgruppe IV: Die restlichen 10 Mäuse erhielten Urin von schwangeren Frauen, der vorher mit Äther ausgeschüttelt worden war, um ätherlösliche Stoffe zu entfernen. Eine Beruhigung der Tiere trat hier ebenso wie nach Injektion von unbehandeltem Urin schwangerer Frauen auf. Der Mittelwert zeigte am 1. Tag eine Abnahme um 8,3%, am 2. Tag um 40,9% und am 3. Tag um 34,7%. Die Differenz der Werte des 2. und 3. Tages vom Normalwert ist statistisch gesichert.

Die oben dargestellten Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß im Harn schwangerer Frauen ein Stoff enthalten ist, nach dessen Injektion

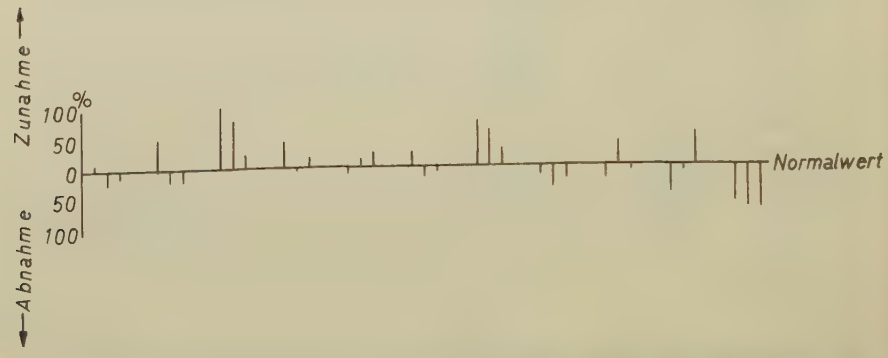


Abb. 3. Änderung der Lauftätigkeit 11 infantiler weiblicher Mäuse nach Injektion von Urin nicht-schwangerer Frauen, der vorher mit Äther ausgeschüttelt war. Je drei zusammenliegende Säulen bezeichnen die Änderung der Lauftätigkeit eines Tieres an den drei Injektionstagen gegenüber dem Wert vor der Behandlung.

bei infantilen weiblichen weißen Mäusen der Lauftrieb absinkt, während ein anderer Stoff im Harn nicht-schwangerer Frauen die Tiere stark anregt. Der beruhigende Stoff ist nicht ätherlöslich, während der anregende Stoff ätherlöslich ist.

Bei der Frage nach dem Wirkungsmechanismus sei folgende Beobachtung erwähnt: Mit einer einzigen Ausnahme waren nach der Injektion von Harn schwangerer Frauen bei allen Mäusen an den Ovarien die für den positiven Ausfall der Aschheim-Zondekschen Probe typischen Veränderungen nachweisbar. Bei einer Maus, bei der die Ovarien völlig unverändert blieben, war während der Injektionstage auch keine Änderung der Aktivität beobachtet worden.

Versuche mit Progynon B oleosum.

Methode.

Infantilen weiblichen Mäusen wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine bestimmte Dosis Progynon B oleosum injiziert. Die Lauftätigkeit der Tiere vor und nach den Injektionen wurde mit dem Kipptellerapparat von Forst bestimmt. In

9 Versuchsgruppen von je 4—8 Tieren erhielten die Mäuse ansteigende Dosen von 0,01—100 γ Progynon injiziert. Die Differenz der Mittelwerte der Aktivität während der Behandlung von den Ausgangswerten zeigte den Einfluß des Follikelhormons auf den Bewegungstrieb. Um die Wirkung des Lösungsmittels ausschließen zu können, wurde einer Versuchsgruppe lediglich Olivenöl injiziert.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse sämtlicher Versuchsgruppen sind in Abb. 4 dargestellt. Die verabfolgten Follikelhormondosen sind auf der Abszisse in

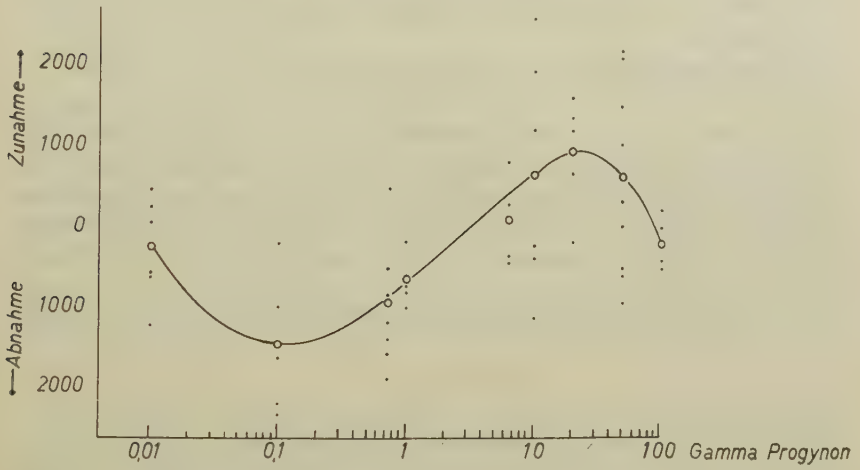


Abb. 4. Dosiswirkungskurve von Progynon B ol. auf die motorische Aktivität weiblicher Mäuse. Waagerechter Maßstab: Dosis von Progynon; senkrechter Maßstab: Zu- oder Abnahme der Lauftätigkeit der Tiere und Behandlung mit Progynon, gemessen in den Maßzahlen des Gerätes für Motilitätsbestimmung von Forst. Punkte: Aktivitätsänderungen der einzelnen Tiere nach Progynon. Kreise: Mittelwert der Änderungen bei je einer Konzentration. Durch die Mittelwerte ist eine Kurve gezeichnet, die sich diesen möglichst gut anpaßt.

logarithmischem Maßstab aufgetragen. Die Ordinate ist nach den Einheiten des Forstschen Aktivitätsmeßgerätes aufgeteilt. Die Einheiten sind das Maß für die Lauftätigkeit.

Die Mittelwerte der Aktivitätsänderung bei verschiedenen Hormondosen liegen recht gut auf einer biphasischen sinusförmigen Kurve, die ihr Minimum bei 0,1 γ, ihr Maximum bei 20 γ und ihren Wendepunkt bei 1,5 γ hat.

Durch diese dosisabhängige biphasische Wirkung des Progynons auf den Bewegungstrieb infantiler Mäuse werden die bisher unverständlichen Ergebnisse von Slonaker und Bugbee u. Simond über das Dosis-Wirkungs-Verhältnis zwischen Follikelflüssigkeit einerseits und Spontanaktivität kastrierter weiblicher Tiere andererseits erklärt.

Zusammenfassung.

Die Lauftätigkeit infantiler weiblicher weißer Mäuse wird durch Injektion von Harn nicht-schwangerer Frauen gesteigert, während sie nach Injektion von Schwangerenharn absinkt. Der anregende Stoff ist ätherlöslich, der beruhigende Stoff dagegen nicht. Die Wirkung des beruhigenden Stoffes auf die Lauftätigkeit tritt nur dann auf, wenn Veränderungen an den Ovarien im Sinne der Aschheim-Zondekschen Reaktion zustande kommen und bleibt bei unveränderten Eierstöcken aus.

Je nach der verabfolgten Menge kann Progynon B. ol. die Lauftätigkeit senken oder steigern. Kleine Mengen (0,1 γ) beruhigen, große Mengen (10 γ) regen an.

Die Dosiswirkungskurve hat Sinusform.

Literatur.

Billings, E. G.: Bull. Hopkins Hosp. **54**, 440 (1934). — Bugbee, E. P., u. A. E. Simond: Endocrinology **10**, 349 (1926). — Forst, A. W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 288 (1938). — Slonaker, J. R.: Amer. J. Physiol. **68**, 294 (1924); **21**, 325 (1928).

Dr. Otto Nacke, Bielefeld, Siekerwall 10, Versorgungsamt. Ärztlicher Dienst.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 225—231 (1953).

Aus der Pharmakologischen Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt der Max Planck-Gesellschaft, Göttingen (Leiter: Prof. Dr. Dr. W. Koll).

Der Einfluß von zugeführter Glucuronsäure auf die Dauer der Avertin-Narkose*.

Von

Hans Kaller und Werner Koll.

(Eingegangen am 31. Juli 1953.)

Als Beitrag zu der Frage, ob präformierte Glucuronsäure vom Organismus zur Koppelung (Entgiftung) verwendet werden kann oder nicht, wurde die Beeinflußbarkeit der Avertin-Narkose durch zugeführte Glucuronsäure geprüft. Die Versuche gingen von der Voraussetzung aus, daß die Narkosedauer von der Entgiftungsgeschwindigkeit abhängt. Das Maß für die Narkosedauer war die „Schlafzeit", d. h. die Zeit von der Applikation des Narkoticums bis zum Aufrichten der Versuchstiere aus Rückenlage. Avertin (Tribromäthanol) wird durch Paarung mit Glucuronsäure entgiftet und als Glucuronosid ausgeschieden (Endoh, Straub).

Versuchsreihe I.

Die Versuche wurden an erwachsenen weiblichen Ratten durchgeführt. Für die Narkosen wurde Avertin „flüssig" (1 g Avertin gelöst in 1 cm^3 Amylenhydrat) verwendet. Die Versuchstiere erhielten in 2%iger Lösung 200 mg/kg per os + 100mg/kg intraperitoneal. Spätestens 2 min nach der Applikation war die Narkose so tief, daß die Tiere in Rückenlage gebracht werden konnten. Diese kombinierte perorale und intraperitoneale Gabe erwies sich aus folgendem Grunde als zweckmäßig: In vorausgehenden Untersuchungen hatte sich herausgestellt, daß bezüglich des Einflusses der Glucuronsäure besonders deutlich Effekte sichtbar wurden, wenn Avertin nur peroral verabfolgt wurde. Nun ist aber die Narkosebreite bei peroraler Zufuhr des Avertins sehr gering, d. h. auch nach Einstellung auf individuelle Narkosedosen kommt es häufig vor, daß — entsprechend der jeweiligen Tagesdisposition — einige Tiere überhaupt nicht bis zur Tolerierung der Rückenlage narkotisiert sind, andere in der Narkose sterben. Durch die kombinierte perorale-intraperitoneale Narkose war es möglich, die günstigen Wirkungsbedingungen für die Glucuronsäure zu erhalten, dabei aber alle Tiere bis zur Tolerierung der Rückenlage zu narkotisieren. Einige wenige empfindlichere Tiere starben bei den Vorversuchen. — In regelmäßigem Turnus wurde alle 2 Tage eine Narkose durchgeführt. (Einige Tiere erhielten im Laufe der Untersuchungen bis zu 20 Narkosen, die sie gut überstanden.) Bei frisch in den Versuch genommenen Tieren ließ sich eine „Gewöhnung" feststellen, die sich darin äußerte, daß besonders nach der ersten Narkose die Schlafzeiten kürzer wurden; von der zweiten Narkose ab zeigten die Schlafzeiten im Mittel eine befriedigende Konstanz. Mit den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde immer erst nach ein oder zwei vorausgegangenen Narkosen begonnen.

---

* Herrn Prof. Dr. Karl Thomas, Göttingen, zum 70. Geburtstag.

Neben den Versuchen mit Glucuronsäure wurden zum Vergleich auch Versuche mit äquimolaren Mengen Glucose angestellt. Die Glucuronsäure bzw. Glucose wurde stets 20 min vor der Avertingabe subcutan injiziert. Es wurden blutisotonische Lösungen verwendet: 3%ige Glucuronsäure- und 5,56%ige Glucoselösungen, wobei letztere zur Herstellung der gleichen molaren Konzentration durch physiologische Kochsalzlösung auf die Hälfte verdünnt wurde. Im Kontrollversuch erhielten die Tiere ein entsprechendes Volumen physiologischer Kochsalzlösung. Die Beachtung der Blutisotonie und der injizierten Flüssigkeitsmengen erwies sich als unbedingt notwendig, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Es hatte sich herausgestellt, daß bei der Injektion hypertonischer (10%iger) Glucuronsäurelösungen die Narkosen verlängert wurden. Dieser verlängernde Effekt wurde als osmotisch bedingt erkannt, denn er ließ sich auch mit hypertonischer Kochsalzlösung und auch bei Narkosen mit Paraldehyd, Luminal, Lachgas und Chloräthyl auslösen. — Die Glucuronsäure wurde stets als frisch bereitetes Natriumsalz injiziert. Die angegebenen Dosen oder Konzentrationen beziehen sich jedoch immer auf die *freie* Glucuronsäure.

Im Hinblick auf die relativ hohen Glucuronsäuredosen, die bei den Untersuchungen gegeben wurden, soll hier noch kurz das Ergebnis der Toxizitätsbestimmungen an Mäusen mitgeteilt werden. Bei Verwendung der *freien* (nicht neutralisierten) Glucuronsäure betrug die LD 50 bei subcutaner Injektion 5 g/kg, bei intravenöser Injektion 4,5 g/kg. Wurde das *Natriumsalz* der Glucuronsäure gegeben, so rief eine intravenöse Injektion von 10 g/kg noch keinerlei Symptome hervor. — Bei den Toxizitätsbestimmungen wurden 20%ige Lösungen verwendet.

Die Versuche wurden für jede einzelne Glucuronsäure- bzw. Glucosedosis nach folgendem Schema durchgeführt:

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Gruppe A. . . .	Kontrolle (NaCl-Lösung)	Glucose	Glucuronsäure
Gruppe B. . . .	Glucuronsäure	Kontrolle (NaCl-Lösung)	Glucose
Gruppe C. . . .	Glucose	Glucuronsäure	Kontrolle (NaCl-Lösung)

20 min danach Avertin 200 mg/kg peroral + 100 mg/kg intraperitoneal.

Durch diese Anordnung (Kreuztest) wurde vermieden, daß durch Änderung der Tagesdisposition oder durch langsame Empfindlichkeitsänderung gegenüber dem Narkoticum gerichtete Fehler entstehen.

Die Versuchstiere wurden immer zur gleichen Tageszeit gefüttert, ebenso wurden die Versuche immer zur gleichen Stunde vorgenommen.

Die Schlafzeiten der einzelnen Versuchstiere differierten stark. (In den Kontrollversuchen betrug die kürzeste beobachtete Schlafzeit 21 min, die längste 193 min.) Bei dem *gleichen* Tier jedoch blieben in den aufeinanderfolgenden Versuchen die Schlafzeiten in der Regel in der gleichen Größenordnung. Die *inter*individuelle Streuung war größer als die *intra*individuelle Streuung. Um den Einfluß der großen interindividuellen

Streuung auf das Ergebnis auszuschalten, wurden bei der Auswertung der Versuche für jedes einzelne Tier die Differenzen aus den Schlafzeiten beim Kontrollversuch und bei dem Glucuronsäure- bzw. Glucoseversuch gebildet. An den so gewonnenen Zahlen wurde dann die Fehlerrechnung durchgeführt, die sich also immer auf die *intra*individuelle Streuung bezieht. Um Mißverständnisse zu vermeiden, sind im folgenden Angaben der interindividuellen Streuung absichtlich fortgelassen (z. B. bei den Zahlenangaben über die mittleren Schlafzeiten), besonders auch, da sie für die Auswertung und das Ergebnis bedeutungslos sind. Die *intra*individuelle Streuung (mittlere Abweichung) bei den einzelnen Versuchsserien schwankte zwischen $\pm 23{,}2$ und $\pm 34{,}2$ min.

Die Ergebnisse sind in der Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *Beeinflussung der Avertin-Narkose durch verschiedene Dosen von Glucuronsäure oder Glucose.*

Avertin 200 mg/kg per os + 100 mg/kg intraperitoneal. Glucuronsäure bzw. Glucose 20 min vor Avertin					
Versuch	Mittlere Schlafzeit Minuten	Mittlere Diff. der Schlafzeiten zur Kontrolle Minuten	Mittlerer Fehler (intra-indiv.)	Zufallswahrscheinlichkeit p	Anzahl der Tiere
Kontrolle (NaCl-Lösung)	89,9	—	—	—	
Glucuronsäure 0,01 Mol/kg = 1,94 g/kg	71,4	— 18,5	± 3,92	< 0,0027	35
Glucose 0,01 Mol/kg = 1,8 g/kg	77,9	— 12,0	± 4,6	< 0,02	
Kontrolle (NaCl-Lösung)	101,3	—	—	—	
Glucuronsäure 0,0075 Mol/kg = 1,46 kg/g	88,6	— 12,7	± 5,15	< 0,02	32
Glucose 0,0075 Mol/kg = 1,35 g/kg	100,0	— 1,3	± 6,05	> 0,8	
Kontrolle (NaCl-Lösung)	80,1	—	—	—	
Glucuronsäure 0,005 Mol/kg = 0,97 kg/g	75,0	— 5,1	± 4,97	> 0,3	32
Glucose 0,005 Mol/kg = 0,9 g/kg	78,2	— 1,9	± 4,6	> 0,6	

Durch hohe Dosen von Glucuronsäure wird die Avertin-Narkose verkürzt. Die bei der hohen Glucosedosis sichtbare Verkürzung läßt sich an dem vorliegenden Zahlenmaterial statistisch nur schwach sichern.

Die Verkürzung der Schlafzeiten durch Glucuronsäure ließ sich auch bei *nur intraperitonealer* Avertingabe (200 mg/kg) nachweisen, jedoch war hier — wie schon erwähnt — der Effekt nicht so groß wie bei kombinierter peroraler-intraperitonealer Avertin-Narkose. Bei 0,01 Mol/kg (= 1,94 g/kg) Glucuronsäure, die 20 min vor der intraperitonealen Avertindosis subcutan gegeben wurde, betrug die Verkürzung —6,55 min, bei einer mittleren Schlafzeit im Kontrollversuch von 68,2 min. Die mittlere Abweichung (intraindividuelle Streuung) betrug $\pm$12,7 min. der einfache mittlere Fehler $\pm$1,54 min (68 Tiere). $p < 0{,}0027$.

Versuchsreihe II.

Nach den Untersuchungen von Mayer und Widmark ist im Hungerzustand die Entgiftungsfähigkeit des Organismus herabgesetzt. In der folgenden Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob das möglicherweise im Hungerzustand bestehende Defizit an disponibler Glucuronsäure sich durch parenterale Zufuhr von Glucuronsäure ausgleichen läßt.

Gegenüber der Versuchsreihe I erhielten die Tiere nur 150 mg/kg Avertin per os + 100 mg/kg Avertin i. p., da Hungertiere weit empfindlicher gegenüber Avertin sind als normal ernährte Tiere. Vor den entsprechenden Versuchen wurde den Tieren für jeweils 24 Std das Futter entzogen. Um zwischen den einzelnen Versuchen den Tieren genügend Zeit zur Auffütterung zu geben, wurden die Versuche in 3tägigem Turnus vorgenommen. Kreuztest wie in Versuchsreihe I. Das Avertin wurde wiederum stets 20 min nach der subcutanen Glucuronsäure- bzw. Kochsalz-Injektion gegeben. Die Glucuronsäuredosis betrug 0,005 Mol/kg (= 0,97 g/kg).

Die Tab. 2 zeigt das Ergebnis.

Tabelle 2. *Beeinflussung der Avertin-Narkose durch Glucuronsäure bei hungernden Tieren.*

46 Tiere. Avertin 150 mg/kg per os + 100 mg/pkg intraperitoneal. Glucuronsäure 0,005 Mol/kg (= 0,97 g/kg) 20 min vor Avertin subcutan

Versuch	Mittlere Schlafzeit Minuten	Mittlere Diff. der Schlafzeiten Minuten	Mittlerer Fehler (intraindiv.)	Zufallswahrscheinlichkeit p
Kontrolle (NaCl-Lösung), normal ernährt	79,2			
Kontrolle (NaCl-Lösung), nach 24 Std *Hunger*	126,2	+ 47,0	$\pm$ 4,8	$< 0{,}0027$
Glucuronsäure 0,005 Mol/kg (= 0,97 g/kg), nach 24 Std *Hunger*	114,8	— 11,4	$\pm$ 3,4	$< 0{,}0027$

Nach 24 Std Hunger ist in diesem Versuch zunächst die starke Wirksamkeitszunahme des Avertins zu sehen.

Weiterhin läßt sich im Hungerzustand eine Verkürzung der Schlafzeiten nach vorheriger Glucuronsäuregabe feststellen, und zwar ist in dieser Versuchsreihe ein Effekt bereits bei einer Glucuronsäuredosis zu sehen, die bei normal ernährten Tieren noch keine deutliche Beeinflussung der Avertin-Narkose zeigte.

Um auszuschließen, daß es sich bei der Wirkung der Glucuronsäure etwa um einen unspezifischen narkoseverkürzenden Effekt handelt, wurde zum Vergleich eine ähnliche Versuchsreihe mit einem Narkoticum durchgeführt, das *nicht* durch Glucuronsäurepaarung entgiftet wird, nämlich mit Evipan-Natrium. Um einen möglicherweise auftretenden Glucuronsäureeffekt sicher sehen zu können, wurde hierbei die doppelte Glucuronsäuredosis (0,01 Mol/kg = 1,94 g/kg) subcutan gegeben. 20 min danach erhielten die Tiere 75 mg/kg Evipan-Natrium per os + 50 mg/kg intraperitoneal.

Es ergaben sich die in Tab. 3 dargestellten Mittelwerte.

Tabelle 3. *Kontrollversuch. Evipan-Natrium-Narkose nach Zufuhr von Glucuronsäure bei hungernden Tieren.*

26 Tiere. Evipan-Natrium 75 mg/kg per os + 50 mg/kg intraperitoneal. Glucuronsäure 0,01 Mol/kg (= 1,94 g/kg) 20 min vor Evipan subcutan

Versuch	Mittlere Schlafzeit Minuten	Mittlere Diff. der Schlafzeiten Minuten	Mittlerer Fehler (intra-indiv.)	Zufallswahrscheinlichkeit p
Kontrolle (NaCl-Lösung) *normal* ernährt	65,5	+ 10,4	± 4,4	< 0,03
Kontrolle (NaCl-Lösung) nach 24 Std *Hunger*	75,9			
Glucuronsäure 0,01 Mol/kg (= 1,94 g/kg) nach 24 Std *Hunger*	73,5	— 2,4	± 6,4	> 0,7

Eine Verlängerung der Schlafzeiten durch den Hunger ist auch bei diesem Evipanversuch festzustellen und läßt sich bei dem vorliegenden Material befriedigend sichern. Auffällig ist, daß beim Avertinversuch die Verlängerung größenordnungsmäßig rund 4mal stärker war als beim Evipanversuch, wenn man die Verlängerungen relativ zu den jeweiligen mittleren Schlafzeiten der normal ernährten Tiere betrachtet. Die Wirksamkeit des Avertins scheint im Hungerzustand weit stärker zuzunehmen als die Wirksamkeit des Evipans.

Die geringfügige Verkürzung nach Glucuronsäure im Evipanversuch liegt durchaus im Bereich des Zufalls und hat keine Bedeutung.

Der Vergleich zwischen Avertin und Evipan stützt die Annahme, daß die Verkürzung der Avertin-Narkose nach Gabe von Glucuronsäure durch eine Paarung des Avertins mit der zugeführten präformierten Glucuronsäure bedingt ist.

Die durch den Hunger hervorgerufene Verlängerung der Avertin-Narkose ist relativ sehr stark gegenüber der Verkürzung, die im Hungerzustand durch Glucuronsäuregaben erreicht wird. Die Diskrepanz ist zu groß, als daß man von einer vollständigen Deckung des Glucuronsäuredefizits im Hungerzustand durch Zufuhr präformierter Glucuronsäure sprechen könnte. Man darf vermuten, daß die Verwendung präformierter Glucuronsäure zur Entgiftung nur *einer* der dem Organismus möglichen Wege der Koppelung mit Glucuronsäure ist, der zudem nur den kleineren Teil der gesamten Entgiftungskapazität ausmacht. Um die Größenordnung der Wirksamkeit anderer Koppelungsmechanismen zu prüfen, wurde in der folgenden Versuchsreihe ein „Gegenversuch" gemacht.

Versuchsreihe III.

Es sollte untersucht werden, ob sich durch eine Kohlenhydratüberfütterung (Anreicherung der Leber mit Glykogen) eine Steigerung der Entgiftungsfähigkeit erzielen läßt. Einige Autoren, z. B. Dziewiatkowski und Lewis, Schmid, Mayer, Quick u. a., sprechen dem Leberglykogen eine entscheidende Rolle bei der Glucuronsäurepaarung zu.

An weiblichen Ratten wurden in 3tägigem Abstand perorale-intraperitoneale Avertin-Narkosen vorgenommen (200 mg/kg per os + 100 mg/kg i. p.). Jeweils eine Gruppe von Versuchstieren erhielt vor dem Versuch 64 Std lang eine 25%ige Glucoselösung als Trinkflüssigkeit zur Glykogenanreicherung. Einer zweiten Gruppe wurde als Kontrolle lediglich Wasser zu trinken gegeben. Um den möglichen Einfluß einer „Wässerung" infolge der größeren Trinkmengen bei Glucosefütterung auszuschließen, wurde einer dritten Gruppe — ebenfalls 64 Std lang — 0,1%ige Saccharinlösung als Trinkflüssigkeit angeboten. Von dieser tranken die Ratten annähernd das gleiche Volumen wie von der Glucoselösung. — In den letzten 2 Std vor der Narkose erhielten alle Tiere Wasser als Trinkflüssigkeit, um den möglichen Einfluß einer alimentären Hyperglycämie beim Glucoseversuch zu vermeiden. — Kreuzversuche wie in Versuchsreihe I.

Das Ergebnis ist in Tab. 4 dargestellt.

Der Versuch zeigt die große Bedeutung, die die Zufuhr größerer Glucosemengen über einen längeren Zeitraum hin für die Entgiftungsfähigkeit des Organismus hat. Die Verkürzungen der Schlafzeiten sind nach Glykogenanreicherungen weit größer, als sich dies jemals durch hohe Glucuronsäuredosen bei normal ernährten Tieren erreichen ließ. (Vgl. Versuchsreihe I.) Durch diesen Befund wird die oben geäußerte Vermutung, daß die Verwendung präformierter Glucuronsäure zur Entgiftung nur einen kleinen Teil der gesamten Entgiftungsreaktion ausmacht, gestützt.

Tabelle 4. *Beeinflussung der Avertin-Narkose durch vorhergehende Glucosefütterung (Glykogenanreicherung).*

28 Tiere. Avertin 200 mg/kg per os + 100 mg/kg intraperitoneal. Vorbehandlung mit verschiedenen Trinkflüssigkeiten 64 Std lang.

Trinkflüssigkeit	Trinkmenge pro 64 Std und kg	Mittlere Schlafzeit Minuten	Mittlere Diff. der Schlafzeiten Minute	Mittlerer Fehler (intraindiv.)	Zufallswahrscheinlichkeit p
Wasser (Kontrolle)	149 cm³	127,5			
Saccharin-Lösung 0,1% (Kontrolle)	360 cm³	124,7	— 2,8	± 9,4	> 0,7
Glucose-Lösung 25%	343 cm³ (= 86 g Glucose pro 64 Std u. kg)	78,2	— 46,5	± 8,3	< 0,0027

Zusammenfassung.

Bei Ratten läßt sich die Narkose mit Avertin (Tribromäthanol) durch vorherige Gabe von Glucuronsäure[1] verkürzen. Zur Erzielung dieses Effektes sind relativ hohe Glucuronsäuredosen erforderlich.

Durch vorhergehende Glucosefütterung (Glykogenanreicherung) läßt sich eine starke Verkürzung der Narkosedauer erreichen.

Die Versuche können dahingehend gedeutet werden, daß die Verwendung von präformierter Glucuronsäure zur entgiftenden Koppelung zwar eine Möglichkeit darstellt, die aber wahrscheinlich nur einen kleinen Teil der gesamten Entgiftungsreaktion ausmacht.

Literatur.

Dziewiatkowski, D. D., and H. B. Lewis: J. of Biol. Chem. **153**, 49 (1944). — Endoh, C.: Biochem. Z. **152**, 276 (1924). — Mayer, P.: Z. klin. Med. **47**, 68 (1902). — Quick, A. J.: J. of Biol. Chem. **70** 59 (1926); **98**, 537 (1932). — Schmid, F.: C. r. Soc. Biol. **123**, 223 (1936). — Straub, W.: Münch. med. Wschr. **30**, 1279 (1928). — Widmark: Biochem. Z. **179**, 272 (1926).

Prof. Dr. Werner Koll, Pharmakologische Abteilung der med. Forschungsanstalt der Max Planck-Gesellschaft, Göttingen.

[1] Die Glucuronsäure wurde uns in Form des Lactons von den Deutschen Maizena-Werken freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 232—244 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle).

Pharmakologische Beeinflußbarkeit reflektorisch-toxischer Digitaliswirkungen (Bradykardie und Erbrechen) über die Herznerven*.

Von
W. Busse und S. J. Loennecken.

(Eingegangen am 17. August 1953.)

Nach Klärung des Veratrinangriffspunktes an den Receptoren des Bezold-Jarisch-Reflexes ist die Frage eines ähnlichen kardio-kardialen reflektorischen Leitungsweges für die toxische Digitalis-Bradykardie wiederholt diskutiert worden (Jarisch u. Richter, Jarisch, Hohensee u. Lendle, Zipf, Lendle, Schäfer, Lendle u. Wienke, Zipf u. Ehrlicher, Busse u. Lendle, Zipf u. Miestereck).

Zipf und Ehrlicher konnten an Katzen, bei denen eine weitestgehende Denervierung des Aortenbogengebietes vorgenommen war, keine Bradykardie mehr auf Digitoxin in hohen Dosen erzielen. Sie neigen daher zu der Ansicht, daß eine kardio-kardiale Reflexbahn beim Zustandekommen einer Digitalisbradykardie bei ihren Versuchstieren keine Rolle spielen könne. Neuerdings haben Zipf und Miestereck im Rahmen von Untersuchungen über Aktionsimpulse in Herznerven unter verschiedenen Lokalanaesthetika nochmals bestätigen können, daß im therapeutischen Dosierungsbereich von Digitalis keine veratrinartigen Entladungen in den Rr. cardiaci N. vagi auftraten, sondern nur eine kontraktionsbedingte Verstärkung pulssynchroner Impulse. Dosierten sie dagegen höher, dann kamen mit Eintritt in den toxischen Wirkungsbereich der Digitalis allerdings in einigen Fällen veratrinartige Dauerentladungen zum Vorschein. Damit sprechen diese Befunde jedoch für die Möglichkeit eines kardio-kardialen Reflexweges im toxischen Dosierungsbereich von Digitalis.

Dieselben Autoren legten eine Untersuchung vor, in der gezeigt wurde, daß verschiedene Lokalanaesthetika imstande sind, die nach Veratringaben in afferenten Herznerven auftretenden Dauerentladungen aufzuheben. Es zeigte sich in ihrer aufschlußreichen Arbeit, daß Lokalanaesthetika für die Receptoren des Bezold-Jarisch-Reflexes eine endoanaesthetische Wirkung entfalten, die aber auch als „Leitungsanaesthesie" ebenso wirksam ist, wenn z. B. Novocain vom Herzbeutel aus seine Wirkung auf die dort verlaufenden Nervenstämme entfaltet.

Bei Lendle und Wienke findet sich bezüglich des Novocains nun die Angabe, daß es intravenös appliziert beim Meerschweinchen die toxische Digitalisbradykardie aufzuheben vermag, und die Autoren schlossen daraus auf eine reflektorische Auslösung der Bradykardie. Auch Busse und Lendle erhielten ähnliche Befunde bei Hunden, an denen sie die Beeinflußbarkeit des Digitaliserbrechens untersuchten.

* Herrn Professor Dr. Thomas, Göttingen, zum 70. Geburtstag gewidmet.

Diese Befunde veranlaßten uns, zu prüfen, ob der antagonistischen Novocainwirkung gegenüber der Digitalisbradykardie eine Reflexunterbrechung an den Herznerven zugrunde liegen könnte, wie es für den Veratrin-Novocain-Antagonismus als erwiesen gelten kann. Als ein weiterer Anhalt zur Frage der reflektorisch-toxischen Digitalisbradykardie über Fasern der Bezold-Jarisch-Reflexbahn sollte hiermit ein Beitrag geliefert werden, denn es wäre ja auch noch die Deutung möglich, daß intramurale Vagusganglien durch intravenöse Novocaingaben gelähmt wurden.

Auch dem Erbrechen als einer weiteren viel diskutierten reflektorisch-toxischen Digitaliswirkung galt im Rahmen unserer Versuchsreihe ein weiteres Augenmerk. Hierin bestehen zwischen dem Veratrin und der Digitalis ebenfalls gewisse Parallelen, die vielleicht eine zusammenhängende Betrachtung beider toxischer Erscheinungsformen gerechtfertigt erscheinen lassen. Bei dem Versuch einer experimentellen Analyse dieser Digitaliswirkungen stellten Busse und Lendle die in der Literatur diskutierten Digitalisangriffspunkte für das Erbrechen kritisch dar und kamen auf Grund ihrer eigenen Versuche mit antagonistischen Stoffen zu dem Schluß, daß es sich auf Grund der verschiedenen Beeinflußbarkeit hierbei um zwei verschiedene Angriffspunkte handeln müsse. Dasselbe scheint auch für das Veratrin nach bisheriger Kenntnis zuzutreffen.

Nach neueren Untersuchungen von Swiss bei verschiedenen Fraktionen aus Veratrum viride besteht eine strenge Parallelität zwischen Blutdruck- und Brechwirksamkeit. Auf Grund antagonistischer Versuche beurteilt er jedoch das Veratrinerbrechen als zentralen Ursprungs. Borison und Fairbanks beschäftigten sich ebenfalls mit dieser Frage und bearbeiteten sie mit Hilfe von neurologischen Ausschaltungsoperationen, die zu dem Ergebnis führten, daß sich das Ganglion nodosum bei ihnen als entscheidend für die Auslösung des Veratrinerbrechens herausstellte.

Die Beurteilung des Digitaliserbrechens bereitet bei Berücksichtigung der einschlägigen Literatur ebenfalls große Schwierigkeiten (vgl. Busse u. Lendle). Im Rahmen unserer Untersuchungen legten wir Wert darauf, die Parallelität in einer möglichen Beeinflussung beider Reaktionen von seiten der Herznerven zur Beantwortung der Frage ihrer Bedeutung bei beiden Reaktionen zu prüfen. Daß das Herz unter anderem bei der Auslösung des Digitaliserbrechens eine Rolle spielen könnte, wird nämlich von Borison und Kushizaki berichtet. Dagegen fanden Gold und Catell bei Vergleich der peroral brechwirksamen und der intravenösen herztoxischen Dosen von Digitalisglykosiden an Katzen keine Parallelität und sie schlossen daraus bezüglich der Brechwirksamkeit auf eine lokale Schleimhautreizung der peroralen Digitalisgaben. Andererseits ließen die Ergebnisse von Lendle und Busse bei Berücksichtigung der zeitlichen Verhältnisse bis zum Eintritt beider Wirkungen an Hunden nach peroralen Gaben (2—4 Std) eher auf eine Koppelung beider Wirkungen schließen.

Zur Beantwortung unserer Fragestellung waren wir auf nichtnarkotisierte Tiere angewiesen. Um an ihnen unter Beobachtung der Herzfrequenz und des Erbrechens eine lokale Einwirkung antagonistischer Stoffe auf die Herznerven durchführen zu können, hatten wir unsere Versuchstiere durch schonendes Einlegen eines Katheters in den Herzbeutel bei vorausgehender Operation unter Vollnarkose vorbereitet.

Versuchsanlage.

Als Versuchstiere benutzten wir 10 ausgewachsene Schäferhunde im Gewicht zwischen 15 und 29 kg.

Einführen des Herzbeutelkatheters. Um akute Versuche durchführen zu können, waren wir bei dem operativen Eingriff zum Einbinden eines Polyäthylen-Katheters auf eine schnell vollständig abklingende Narkose angewiesen. Diese wurde mit Chloräthyl eingeleitet. Nach eingetretener Narkose injizierten wir 0,75—1,0 mg/kg Succinylcholinchlorid (Asta)[1] intravenös und setzten Chloräthyl ab. Die Hunde wurden nun sofort intubiert und an eine Starling-Pumpe angeschlossen, die den Hund aus einem vorgeschalteten Draeger-Lachgas-Narkosegerät (10% N_2O, 90% O_2) beatmete. Die Succinylcholinlähmung hielt 20—30 min an. Nach Rückkehr der Spontanatmung wurden die Hunde extubiert. Innerhalb von weiteren 30 min zeigte sich keine Beeinträchtigung mehr durch die Narkose, so daß mit dem Versuch begonnen werden konnte. Bei einem Teil der Tiere führten wir die vorbereitende Operation am Vortage durch und benutzten Evipan (20 mg/kg) als Basis-Narkoticum neben Succinylcholin und künstlicher Beatmung.

Zur Herzbeutelkatheterisierung öffneten wir den Thorax im Bereich des Zwischenrippenraumes über dem Herzspitzenstoß in einer Länge von etwa 4 cm. Mit Hilfe einer stumpfen Pinzette wurde der Herzbeutel angehoben und durch eine seitlich durch die Brustwand geführte weitlumige Kanüle angestochen. Durch die Kanüle wurde ein 1,5 mm dicker Polyäthylenkatheter 10 cm weit in den Herzbeutel vorgeschoben und die Kanüle über ihm zurückgezogen. Es folgte schichtweiser Verschluß der Operationsstelle und Absaugen des Pneumothorax.

Unter täglicher Behandlung der Tiere mit 200000 I. E. Hydrocillin (= 75% Procain-Penicillin G und 25% krist. Penicillin G) (Penicillin-Ges. Göttingen)[1] i. m. und Spülung des Herzbeutels durch den Katheter mit 10000 I. E. krist. Penicillin G war es möglich, die Hunde vor schweren Infektionen zu bewahren und sie bis zu 6 Tagen im Versuch zu halten. Wie die Sektionen der Tiere zur Kontrolle der Lage des Herzkatheters am Ende einer Versuchsserie zeigten, hatte sich aber im allgemeinen nach 3—4 Tagen eine Verklebung der Herzbeutelblätter durch Fibrinabscheidung infolge des mechanischen Reizes durch den Katheter gebildet. Wir zogen deshalb zur Auswertung nur die Versuche bis zum 2. Tag post operationem heran.

Zur Erzielung toxischer Digitaliswirkungen (Bradykardie und Erbrechen) benutzten wir Digitoxin (Hoffmann-La Roche) und k-Strophanthidin, das wir Professor Neumann-Würzburg verdanken. Beide Stoffe wurden ausgehend von einer alkoholischen Stammlösung als Lösung 3×10^{-4} in 1% Adhägon-Ringer-Lösung weiter verdünnt. Die Dosierung war auf eine sichere Brechwirksamkeit eingestellt. Sie lag beim Strophanthidin bei 0,1 mg/kg, beim Digitoxin bei 0,12 mg/kg i. v. Das letzte wurde in einigen Fällen auch mit 0,22 mg/kg i. m. dosiert. Hierbei kam es zu starken Brechreaktionen und deutlicher Bradykardie.

---

[1] Der Herstellerfirma danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

Eine antagonistische Beeinflussung dieser Reaktionen über die „Herznerven" prüften wir mit Novocain. Daneben wurden vergleichsweise Benadryl, Megaphen[1] und Tetraäthylammoniumbromid (TEA) angewandt. Ihre intraperikardiale Verabreichung geschah entweder, nachdem sich eine Digitoxinwirkung zeigte oder vor einer Strophanthidin-Injektion. Die intraperikardiale Injektionsmenge überschritt nie 0,15 cm³/kg. Unsere Ergebnisse stützen sich auf 60 Einzelinjektionsversuche.

Die Registrierung der Herzfrequenz wurde elektrokardiographisch vorgenommen (Extremitätenableitung durch Nadelelektroden; Siemens-Zweikoffergerät)[2]. In Abständen von 2—15 min wurde ein EKG aufgenommen (II. Ableitung). Das Verhalten des Hundes, insbesondere hinsichtlich Erbrechen, wurde protokolliert.

Versuchsergebnisse.

A. Novocain intraperikardial.

Zunächst soll das Verhalten der *Herzfrequenz* betrachtet werden. Eine Zusammenstellung typischer Beobachtungen findet sich in Tab. 1.

Die Wirkung von intraperikardial appliziertem Novocain ohne Vor- oder Nachbehandlung mit Digitalis wurde zuvor festgestellt. Bei einer

Tabelle 1. *Herzfrequenzen unter Novocain und Digitoxin.* Ausgangsfrequenz = 100 gesetzt. Zahlen in ( ) bedeutet: Kammerfrequenz bei AV-Block.

Ausgangsfrequenz	Novocain mg/kg	bis 5 min	bis 10 min	Digitoxin i. v.	bis 15 min	bis 20 min	bis 25 min	bis 30 min	bis 40 min	bis 50 min	bis 60 min
A. Novocain allein i. pc.											
90 = 100	7,5	146	158		181	202	201	182	123	130	
132 = 100	2,5	96	99		129	106	101	96	95		
B. Novocain nach Digitoxin. (0,22 mg/kg i. m.)											
46 – 100	5,0	235—283	305		326	406 (246)	311 (194)		218 (165)	141	
71 = 100	7,5	185—197	199		206	231	257	281	214 (113)	142 (100)	
C. Digitoxin nach Novocain.											
99 = 100	5,0			0,08 mg/kg	148	119	132	132	98	137	143
118 – 100	7,5	120		0,12 mg/kg	132	165	116	90	85	124	126

Dosierung von 7,5 mg/kg zeigte sich, daß es zu einer tachykarden Reaktion kommt (s. Tab. 1, A). Das Maximum dieser Reaktion lag mit einer Frequenzsteigerung um etwa 100% zwischen der 15. und 25. min nach der Injektion. Nach 30 min ist die Frequenz auf den annähernden Ausgangswert wieder abgefallen.

[1] Chemische Bezeichnungen siehe S. 237—238.

[2] Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* sei für die Überlassung des Gerätes gedankt.

In zahlreichen Versuchen ergab sich weiterhin, daß unmittelbar nach der intraperikardialen Injektion, offenbar als Reiz auf die Flüssigkeitsapplikation in den Herzbeutel, sich eine mäßige Frequenzsteigerung einstellte, der aber eine eigentliche Tachykardie nach Novocain erst nach etwa 10 min folgte. Zweifellos ist diese „Initialreaktion" als Zeichen einer Irritation durch die injizierte Flüssigkeitsmenge aufzufassen, die nach einiger Zeit wieder abklingt, wie es sich auch bei einigen Kontrollen mit Ringer-Lösung zeigte.

Eine geringere Dosierung von Novocain rief eine flüchtige, sehr schwache Tachykardie hervor. 2,5 mg/kg Novocain waren z. B. nach 25 min nicht mehr frequenzwirksam und das Maximum ihrer Wirkung mit einer Frequenzsteigerung um nur 15% lag zwischen der 10. und 15. min post injectionem.

In den folgenden Versuchen waren nun die Hunde mit einer Digitoxindosis (0,22 mg/kg intramuskulär) vorbehandelt worden, und nachdem sich Bradykardie und Erbrechen eingestellt hatte, wurde Novocain intraperikardial (5,0 und 7,5 mg/kg) injiziert (s. Tab. 1, B). In beiden Fällen setzte sofort eine starke, tachykarde Reaktion ein, die die Digitoxinbradykardie unterbrach. Nach 5,0 mg/kg Novocain lag das Maximum der Tachykardie zwischen der 15. und 20. min post injektionem. Nach 7,5 mg/kg lag es zwischen der 25. und 30. min. In beiden Fällen wurde die Ausgangsfrequenz um mehrere 100% überschritten. Im Laufe der Novocaineinwirkung kam es zu einem A.V.-Block, so daß die Kammerfrequenz entsprechend niedriger lag. Nach 40 min bzw. nach 50 min war die Novocainwirkung abgeklungen.

Im Vergleich zu den Versuchen mit Novocain ohne Digitalisvorbehandlung läßt sich aus den Frequenzwerten ablesen, daß die Tachykardie vielleicht etwas stärker und länger anhaltend eintrat, wenn es sich dabei um die Aufhebung einer toxischen Digitalisbradykardie handelte. Der A.V.-Block während der Tachykardie ließ sich entweder einer gleichsinnigen Überleitungsbeeinflussung durch Digitoxin und Novocain zuschreiben, oder aber er beruht auf der Digitoxinwirkung allein, stellte sich aber erst dar, nachdem eine Tachykardie an die Überleitung besonders hohe Ansprüche stellte. Die letzte Deutung ist wohl wahrscheinlicher, weil sich unter Novocain allein sonst bei uns keine stärkere Verlängerung der Überleitungszeit im EKG zeigte und in den vorher erwähnten Ursachen die kleinere Dosis Novocain (bei einer stärkeren Digitoxinbradykardie) die stärkere Überleitungsstörung hervorrief. (Über die Wirkungen der hier angewandten Stoffe auf einzelne Kriterien im EKG soll an anderer Stelle noch ausführlicher berichtet werden.)

Wenn wir nun Digitoxin intravenös injizierten, nachdem vorher Novocain intraperikardial appliziert worden war (s. Tab. 1, C), und zwar nach der 10. min, d. h. mit Beginn der eigentlichen Novocaintachykardie, dann erhielten wir etwas abweichende Ergebnisse. Unter 5,0 mg/kg

Novocain entstand nach der intravenösen Injektion von 0,08 mg/kg Digitoxin nur eine mäßige Tachykardie von maximal 32% Steigerung gegenüber der Ausgangsfrequenz. Unter 7,5 mg/kg Novocain stellte sich nach 0,12 mg/kg Digitoxin jedoch eine deutliche Tachykardie dar, die aber relativ rasch wieder abklang. Zwischen der 30. und 40. min war in beiden Fällen eine Frequenz etwas unterhalb der Ausgangswerte wieder erreicht. Doch entstand bei dieser Versuchsanordnung nach der 40. min post Novocain eine zweite Phase mäßiger Tachykardie über die 60. min hinweg, was wir in der Reihenfolge der Applikationen erst Novocain, dann Digitoxin, nie beobachten konnten. Zeitlich kann es sich hierbei nicht mehr um eine Novocainwirkung gehandelt haben.

Hinsichtlich der Beeinflußbarkeit des *Digitaliserbrechens* seien folgende Befunde angeführt (s. Tab. 2).

Tabelle 2. *Erbrechen nach Digitalis und Novocain.*

Digitalis mg/kg	Novocain mg/kg intrapericardial	Erbrechen	
		Anzahl	min n. Novocain
Digitoxin 0,12 i. v.	5,0	9 ×	12—62
Digitoxin 0,12 i. v.	7,5	3 ×	36—46
Digitoxin 0,12 i. v.	7,5	4 ×	19—40
Strophanthidin 0,1 i. v.	2,5	4 ×	1— 8
Strophanthidin 0,1 i. v.	5,0	7 ×	5—12

Eine deutliche Unterdrückung des Erbrechens war demnach in keinem Falle zu erzielen. Sowohl nach Digitoxin als auch nach Strophanthidin erbrachen die Hunde mehrere Male unter der gleichzeitigen Einwirkung von Novocain. Da sich die einzelnen Tiere in ihrer Brechreaktion etwas unterschiedlich verhielten, ist es schwer zu sagen, ob ein geringer Grad von Abschwächung erreicht wurde. Sicher ist jedoch, daß keine Aufhebung des Erbrechens durch eine Blockade der Herznerven möglich war.

B. Einwirkung anderer lähmender Stoffe vom Herzbeutel.

(Benadryl, Megaphen, Tetraäthylammonium.)

Zur weiteren Klärung unserer Fragestellung nach der Bedeutung der Herznerven bei toxischen Digitaliswirkungen wandten wir uns einigen anderen, verschiedenartig wirksamen Stoffen[1] zu:

1. Benzylhydril-β-dimethyl-amino-äthyläther (*Benadryl*, Parke, Davis & Co.).

[1] Den Herstellerfirmen danken wir an dieser Stelle für die Überlassung von Versuchsmaterial.

2. N-(3'-dimethylamino)-propyl-3-chlorophenothiazin (*Megaphen*, Bayer).

3. Tetraäthylammoniumbromid (*Tetramon*, Nordmark).

Während beim Novocain in der gewählten Dosierung die lokalanaesthetischen Wirkungen im Vordergrund stehen, müssen hier starke Antihistaminwirkungen, vagolytische, sympathicolytische sowie zentralsedative Wirkungen und Ganglienblockade mit berücksichtigt werden.

Lokalanaesthetische Wirkungen gehören zu den hervorstechendsten Eigenschaften der verschiedenen Antihistaminika. An der Meerschweinchenhaut ausgetestet erwies sich Benadryl 2,5mal so wirksam wie Novocain (Dews und Graham; Graham). Leavitt und Code fanden in guter Übereinstimmung mit den vorigen Angaben, daß Benadryl 1:500 mit einer Novocainlösung 1:200 wirkungsgleich sei. Es soll dagegen in einer Lösung von 0,1—1%ig noch gewebsfeindlich sein und auf Schleimhäuten lokale Irritationen und hämorrhagische Ulcerationen hervorrufen können (Gruhzit und Fisken).

Für das Megaphen, als Abkömmling der Phenothiazin-Reihe, dürfen ebenfalls, wenn auch etwas schwächere, Antihistaminwirkungen angenommen werden. Lokalanästhetische Eigenschaften soll es auch in einem etwas geringeren Maße besitzen, jedoch noch ebenso starke wie das Novocain. Die 0,5%ige Lösung soll am N. Ischiadicus eine 24 Std anhaltende Nervenausschaltung hervorrufen und dabei keine histologisch erfaßbaren irreversiblen Nervenschädigungen setzen (Angaben der Herstellerfirma).

Beim Tetraäthylammonium dagegen liegen keine wesentlichen lokalanästhetischen Fähigkeiten vor (Gordon, Moe und Freyburger).

In Tab. 3 sind die Wirkungen von intraperikardial verabreichtem Benadryl, Megaphen und TEA auf die Herfzrequenz mit und ohne gleichzeitige Digitoxineinwirkung zusammengestellt.

Benadryl rief entsprechend seiner kräftigeren lokalanästhetischen Wirksamkeit schon in der Dosierung von 2,5 mg/kg eine stark tachykarde Herzaktion hervor (s. Tab. 3, A). Diese war bei 5,0 mg/kg (allerdings einer niedrigeren Ausgangsfrequenz) noch ausgesprochener. Die Maxima der Wirkungen lagen bei der 20.—30. bzw. der 15.—25. min nach der Injektion. Die Wirkung war in beiden Dosierungen nach 60 min noch nicht völlig abgeklungen. Waren die Hunde mit Digitoxin (0,12 mg/kg intravenös) vorbehandelt worden, so war ebenfalls eine tachykarde Reaktion mit Benadryl zu erzielen. Diese war in einem Falle stärker ausgeprägt als ohne Digitoxinvorbehandlung. Im anderen Falle, bei dem Digitoxin 26 min vorher gegeben worden war und noch nicht zu einer Bradykardie geführt hatte, fiel die Tachykardiereaktion auf Benadryl auch entsprechend geringer aus. Das Maximum der Wirkung lag hier um die 15. min, im vorigen Versuch dagegen zwischen der 30. und 40. min.

Megaphen, in den Herzbeutel injiziert, führte nur zu einer schwachen Tachykardie (s. Tab. 3, B). Das Maximum der Wirkung wurde zwischen der 5. und 10. min post injectionem erfaßt. Zwischen der 40. und 50. min

Tabelle 3. *Herzfrequenzen unter Benadryl, Megaphen, TEA gegenüber Digitoxin.* Ausgangsfrequenz = 100 gesetzt.

Ausgangs-frequenz	mg/kg	Digitoxin intravenös	bis 5 min	bis 10 min	bis 15 min	bis 20 min	bis 25 min	bis 30 min	bis 40 min	bis 50 min	bis 60 min und mehr
A. *Benadryl i. pc.*											
123 = 100	2,5		110—130	130		158		163	156	137	120
70 = 100	5,0		171	247		300	275	207	183	154	154
94 = 100	2,5	55 min vorher 0,12 mg/kg	142	146	147	145		195	234- 162	164	147
120 = 100	2,5	26 min vorher 0,12 mg/kg	153		175	141	123		94	125	113
B. *Megaphen i. pc.*											
126 = 100	2,5		113	148		122	126	124	100	129	102
90 = 100	2,5	32 min vorher 0,12 mg/kg	142—195	186	158	139	96	167	197	120	209—164
C. *T. E. A. i. pc.*											
100 = 100	5,0		148	148	111	109	122	134	133	80	66
115 = 100	10,0		126	138		130	122	120	111—115		105
79 = 100	5,0	36 min vorher 0,12 mg/kg	127	150	176	195		118	73	150	128
100 = 100	15,0	270 min vorher 0,22 mg/kg i. m.	149	237	234	220		188	190	165	167

war vielleicht noch eine zweite, schwächere Tachykardiereaktion angedeutet. Nach einer Digitoxinvorbehandlung (0,12 mg/kg intravenös) zeigte sich ebenfalls eine sofortige tachykarde Reaktion um die 5. min post injectionem, die diesmal allerdings viel stärker ausgeprägt war, mit einem allmählichen Abklingen bis zur 25. min. Danach wurden bis zur 60. min nochmals 2 flüchtige Tachykardieperioden erfaßt.

Tetraäthylammonium in der Dosierung von 5,0 und 10,0 mg/kg in den Herzbeutel injiziert, führte in beiden Dosierungen zu einer mäßigen Frequenzerhöhung. Diese war um die 10. min post injectionem am stärksten ausgeprägt und klang bis zu 60. min allmählich ab. Bei der niedrigeren Dosierung tauchten inzwischen noch einige höhere Frequenzwerte auf, die aber in diesem Fall darauf beruhen dürften, daß der Hund infolge äußerer, besonderer Einflüsse unruhig war. Unter Digitoxinvorbehandlung kam es zu einer verstärkten Tachykardiereaktion durch TEA. Die Dosierung von 5,0 mg/kg TEA zeigt dies besonders deutlich im Vergleich zum entsprechenden Parallelversuch ohne Digitoxin. Das Maximum lag hier zwischen der 15. und 20. min. Die dreifache Dosis führte schneller zu einer stärkeren Tachykardie, die nach 60 min noch nicht wieder abgeklungen war.

Gegenüber dem *toxischen Digitaliserbrechen* zeigte Megaphen am deutlichsten eine abschwächende Wirksamkeit (s. Tab. 4). Gemessen an der Brechhäufigkeit ließe sich vielleicht dem Benadryl auch ein abschwächender Effekt in geringem Maße zuschreiben, wenn wir es mit

Tabelle 4. *Digitoxin-Erbrechen nach Benadryl, Megaphen und TEA.*

Digitoxin mg/kg intravenös	mg/kg intrapericardial	Erbrechen	
		Minuten von bis	Anzahl
0,12	Benadryl 2,5	15—48	3 ×
0,12	Benadryl 2,5	6—33	3 ×
0,12	Benadryl 2,5	10—38	2 ×
0,12	Megaphen 2,5	23	1 ×
0,12	Megaphen 2,5	—	—
0,12	TEA 5,0	2—39	4 ×
0,12	TEA 5,0	5—75	8 ×
0,12	TEA 10,0	6—75	7 ×

den Brechhäufigkeiten nach TEA-Behandlung vergleichen, das bei der Applikation in den Herzbeutel sicherlich keinerlei brechhemmende Wirkung von dort aus entfaltete. Busse und Lendle fanden dagegen das TEA gegen das toxische Digitaliserbrechen in geringem Maße wirksam, wenn es intravenös (20 mg/kg) verabreicht wurde, und sie nahmen an, daß dies nicht seiner ganglienblockierenden Fähigkeit zuzuschreiben war, da das Pendiomid bei ihnen nicht gleiche antagonistische Fähigkeiten zeigte.

Besprechung der Ergebnisse.

Kritisches zur Bewertung der Frequenzbefunde.

Es wäre denkbar, daß die Applikation einer Lösung in den Herzbeutel eines nichtnarkotisierten Hundes unabhängig von der pharmakologischen Wirkung dieser Lösung als ein unspezifischer Reiz wirkend die Herzaktion beeinflussen könnte. In Kontrollversuchen mit RINGER-Lösung (Zimmertemperatur) haben wir dies auch bestätigen können, sahen dabei aber, daß sich die mäßige Frequenzsteigerung spätestens nach 10 min wieder normalisiert hatte. Für diese Reaktion dürfte einerseits der Kältereiz, die Flüssigkeitszunahme im Herzbeutel, zum anderen bei Giftlösungen aber eventuell auch ein Gewebsreiz auf das Epithel des Epi- und Perikards verantwortlich zu machen sein. Bei unseren Tieren sahen wir diese Wirkung besonders beim Benadryl, indem sie sich die ersten 5 min nach der Injektion unruhig verhielten und erst nach Einsetzen der vollen anaesthetischen Wirkung wieder ruhig wurden. Ähnliches, aber nicht so ausgeprägt, beobachteten wir beim Megaphen und TEA. Somit wären die Frequenzbefunde vor Ablauf von etwa 5 min nur mit Zurückhaltung auf das für uns wichtige Reflexgeschehen auszulegen.

Die Herzfrequenz ist aber auch von der Coronardurchblutung abhängig. Diese unterliegt zweifellos auch einer Beeinflussung durch die in den Herzbeutel gebrachte Lösung. In unseren Versuchen sahen wir nach Benadryl und Megaphen im EKG Veränderungen im Sinne eines Herzinfarktes, die aber zeitlich begrenzt waren und somit nicht auf einem echten Infarkt beruhen konnten. Immerhin könnte ein gewisser Grad von Herzbeschleunigung durch Drosselung der Coronardurchblutung bedingt sein, wenn auch wohl nicht die extremen Tachykardien, die wir teilweise erhielten.

Es soll ferner erwähnt werden, daß wir eine vorwiegend durch ventrikuläre Extrasystolie bedingte Tachykardie nicht verwerteten und den Frequenzangaben nur den Sinusrhythmus zugrunde legten. Wegen Überwiegens eines ventrikulären Rhythmus und anderer Rhythmusstörungen eigneten sich z. B. die Befunde nach intravenösen Strophanthidininjektionen besonders schlecht zur Auswertung hinsichtlich der Frequenzbeeinflussung, und wir sehen deshalb von ihrer Wiedergabe ab. Am 2. oder 3. Versuchstage zeigten einige Hunde multiple ventrikuläre Extrasystolen, die wohl durch den Fremdkörperreiz des Katheters hervorgerufen waren. Oder aber es bestand dann verschiedentlich von vornherein eine Tachykardie, die auf einem Herzbeutelerguß beruhte. Solche Versuche wurden ebenfalls nicht ausgewertet.

Schwankungen der Herzfrequenz während des Einzelversuches konnten manchmal dadurch hervorgerufen werden, daß das EKG kurz vor oder nach einem Brechakt aufgenommen wurde. Ein solcher Frequenzbefund gliedert sich dann zeitweise nicht in eine allgemeine Verlaufstendenz ein.

Trotz dieser kritischen Einwände gibt die Zusammenstellung der durchschnittlichen Frequenzsteigerung während einer Beobachtungsperiode von 40—50 min gegenüber dem Ausgangswert einen Überblick, der die tatsächlichen Verhältnisse gut wiedergibt (s. Tab. 5). Danach rufen alle geprüften Stoffe in geeigneter Dosierung bei intraperikardialer Applikation eine Frequenzsteigerung hervor, die mit einem Maximum zwischen der 5. und 25. min eine Tendenz zum Abklingen zeigt. Nach Digitoxinvorbehandlung fällt die relative, aber auch wohl die absolute Frequenzsteigerung stärker aus. Sie setzt vielleicht etwas später ein und hält im allgemeinen länger an als ohne Vorbehandlung.

Obwohl sich keiner der in den Herzbeutel injizierten Stoffe als absolut brechverhütend erwies, läßt sich doch beim Megaphen und beim Benadryl, gemessen an der Brechhäufigkeit, eine gewisse antiemetische Wirksamkeit ablesen. Beim Megaphen scheint sie am kräftigsten zu sein. Diese antiemetische Wirkungskomponente ist allerdings bei beiden Stoffen bekannt (Chen u. Ensor, Courvoisier u. Mitarb.), und es

Tabelle 5. *Durchschnittliche Tachykardie.*

	ohne Digitoxin	Digitoxinvorbehandelt
Novocain (gr. Dos.)	++	+++
Benadryl (kl. Dos.)	+	++
Megaphen	(·)	±
TEA	±	(+)

Durchschnittsfrequenzen: bis 120: ±; bis 130: (+); bis 150: +; bis 200: ++; über 200: +++ (gegenüber Ausgangsfrequenz = 100).

liegt sehr nahe anzunehmen, daß es sich hierbei unter unseren Versuchsbedingungen um keine spezifisch vom Herzbeutel ausgelöste Abschwächung des Erbrechens gehandelt hat, weil sie unter gleichen Bedingungen beim Novocain trotz gleichsinniger Frequenzbeeinflussung nicht gesehen wurde. Vielmehr dürfte sie nach Resorption durch Dämpfung des Brechzentrums zustandegekommen sein. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß die Hunde nach Verabreichung von Megaphen und Benadryl apathisch und schläfrig wurden.

Somit ergibt sich zusammenfassend, daß es sich bei den beiden toxischen Digitaliswirkungen um an verschiedenen Orten ausgelöste Reflexe handeln muß. Nach unseren Versuchen *scheinen die Herznerven bei der Auslösung des Digitaliserbrechens keine Rolle zu spielen.* Diese Feststellung gewinnt an Gewicht mit der *unter den gleichen Versuchsbedingungen sicher aufhebbaren toxischen Digitalisbradykardie*, und zwar durch Stoffe, die einerseits durch ihre lokalanästhetische Wirkung, andererseits durch vagolytische und ganglienblockierende Fähigkeiten charakterisiert sind. Daß es sich jeweils um eine Sinustachykardie handelte, verdient in diesem Zusammenhang hervorgehoben zu werden.

Andererseits lassen diese Beobachtungen aber auch den *reflektorischen Charakter der Digitalisbradykardie* deutlich hervortreten. Da Zipf und Mitarb. den kardio-kardialen Bezold-Jarisch-Reflex durch Herzbeutelanästhesie ausschalten konnten, möchten wir zur Deutung unserer Versuchsergebnisse ebenfalls in Parallele dazu die Blockierung eines kardio-kardialen Reflexweges heranziehen.

Wenn Zipf und Ehrlicher an Katzen nach völliger Denervierung des Aortenbogens auf Digitoxin keine Bradykardie mehr erhalten konnten, so spricht dieser Befund zwar gegen diese Deutung, doch kann als Einwand erhoben werden, daß sie

an Kaninchen andrerseits Ergebnisse erhielten, die für einen kardio-kardialen Mechanismus sprechen könnten, und für Hunde, die wir benutzten, liegen unseres Wissens keine entsprechenden Untersuchungen vor. In einer späteren Arbeit berichten Zipf und Miesterecк dann allerdings, wie eingangs schon erwähnt, daß sie nach höheren Digitalisdosen von den Herznerven auch veratrinartige Dauerentladungen sahen. Wie sich ja auch in unseren Versuchen zeigte, konnte es bei verschiedenen Hunden unter der gleichen Digitoxindosis zu keiner oder einer verschieden stark ausgeprägten Bradykardie kommen, so daß wir den vorher zitierten Einwand als nicht mit unseren Ergebnissen und ihrer Deutung völlig unvereinbar auffassen möchten.

Die tachykarde Wirksamkeit der in den Herzbeutel injizierten Stoffe bei nicht digitoxinvorbehandelten Tieren läßt sich bei den Hunden als typischen „Vagustieren" natürlich über eine „pharmakologische Entzügelung" der Herzaktion verstehen. Daß diese aber im Verhältnis zur Ausgangsfrequenz umso stärker ausfiel, je ausgeprägter die vorausgehende Digitalisbradykardie war, läßt sich wiederum einleuchtend über die Entzügelung des durch Digitoxin verstärkten, d. h. Bradykardie erzeugenden, Reflexvorganges an seinem afferenten oder efferenten Schenkel erklären. Novocain dürfte hierbei vorwiegend über afferente Fasern, TEA, das keine anästhetische Fähigkeiten besitzt, dagegen über den efferenten Schenkel (Herzganglien), also zum Teil resorptiv, und die beiden anderen Stoffe (Benadryl und Megaphen) mit gemischten Wirkungen über beide Schenkel des Reflexbogens wirksam werden.

Zusammenfassung.

An nichtnarkotisierten Hunden, die operativ durch Einlegen eines Polyäthylenkatheters durch die Brustwand in den Herzbeutel vorbehandelt worden waren, wurde die Beeinflußbarkeit toxischer Digitaliswirkungen (Bradykardie und Erbrechen) durch in den Herzbeutel applizierte, lähmende Stoffe untersucht.

Das Erbrechen ließ sich durch keinen der angewandten Stoffe (Novocain, Benadryl, Megaphen und Tetraäthylammonium) völlig unterdrücken. Eine gewisse Dämpfung, gemessen an der Brechhäufigkeit, wurde nach Megaphen und Benadryl gesehen. Dies wurde auf Grund der bekannten antiemetischen Wirkung dieser beiden Stoffe als Resorptionseffekt aufgefaßt. Für den Digitalisbrechreflex scheint demnach das Herz keine entscheidende Rolle zu spielen.

2. Durch die lokalanästhetische, vagolytische bzw. ganglienblockierende Wirkungskomponente dieser Stoffe entstand nach ihrer Applikation in den Herzbeutel eine Tachykardie, die nach Benadryl am stärksten und nach TEA am schwächsten ausfiel. Unter einer Digitalisbradykardie fiel diese Frequenzerhöhung stärker aus. Es wird daher auf eine reflektorische kardio-kardiale Auslösung der Digitalisbradykardie über die Herznerven geschlossen.

Literatur.

Borison: J. of Pharmacol. **104**, 396 (1952). — Borison and Fairbanks: J. of Pharmacol. **105**, 317 (1952). — Busse u. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 159 (1953). — Chen and Ensor: J. of Pharmacol. **98**, 245 (1950). — Courvoisier, Fournel, Ducrot, Kolsky u. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1952). — Gold and Cattell: J. of Pharmacol. **98**, 337 (1950). — Gordon, Moe and Freyburger: Pharmacol. Rev. **2**, 61 (1950). — Hohensee u. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 388 (1949). — Jarisch: Wien. klin. Wschr. **1949**, 1. — Jarisch u. Richter: Klin. Wschr. **1939**, 185. — Kushizaki: Fol. Pharmacol. Japan **42**, 148 (1947); zit. n. Mercks Jahresber. **63**, 18 (1949). — Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **208**, 197 (1948/49). — Lendle u. Wiencke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 373 (1951). — Lendle u. Busse: Klin. Wschr. **1952**, 264. — Schäfer: Erg. Phys. **46**, 95 (1950). — Swiss: J. of Pharmacol. **104**, 76 (1952). — Zipf: Klin. Wschr. **1950**, 593. — Zipf u. Ehrlicher: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 529 (1951). — Zipf u. Miestereck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 64 (1953).

Dr. med. Wolfgang Busse, Göttingen, Pharmakolog. Institut, Geiststraße 9.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 245—250 (1953).

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. J. Kühnau).

Immunologische und polarimetrische Untersuchungen von Eiweißkörpern und Netzmitteln*.

2. Mitteilung.

Von
V. Klingmüller und W. Schroeder.

(Eingegangen am 17. August 1953.)

Die nicht-ionenaktiven Dodecylpolyäthylenoxydäther („Sch 600 R_{1-4}") zeigten entsprechend ihrer geringen Toxizität keinen wesentlichen Einfluß auf Eiweißkörper. Das Serum-Elektropherogramm blieb unbeeinflußt und das Elektropherogramm des Corneaepithels zeigte nur geringe Veränderungen (Klingmüller u. Schroeder). Die Wirkungen der kationogenen und anionogenen Netzmittel auf Proteine sind sehr ausgesprochen und zum Teil ausführlicher untersucht. Sie beeinflussen die Molekülgröße, Löslichkeit, Denaturierbarkeit, Lichtzerstreuung (Friend), Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld (Jerchel), die Hämolysierbarkeit der Erythrocyten (Breusch u. Mitarb.) und stehen mit diesen Eigenschaften in enger Beziehung zu den anderen Bedingungen der Lösungen wie p_H, Ionen-Konzentration usw.

Um diese Verhältnisse für die nicht-ionenaktiven Netzmittel zu präzisieren, wurde erstens durch Immunisierungsversuche am Kaninchen festgestellt, ob diese Netzmittel den Antigencharakter ändern. Mit Invertseifen sind solche Versuche bereits ausgeführt, aber zum Teil zweifelhaft geblieben (Schmidt). Mit verschiedenen Polyäthylenoxydalkyläthern ließ sich immerhin die Blutgerinnungszeit bei klinischer Dosierung in intravenöser und subcutaner Applikation praktisch nicht beeinflussen (Soehring, Nasemann).

Zweitens wurde untersucht, ob die optische Aktivität von Proteinen durch ionogene und nicht-ionenaktive Netzmittel beeinflußt wird, besonders im Zusammenhang mit den Arbeiten von E. Brand, in denen der Einfluß der Peptidbindung auf den Drehbeitrag der einzelnen ins Peptid eingebauten Aminosäure bekannt wurde. Veränderungen der Drehung von Proteinen durch Netzmittel würden einen Vorgang in der

* Herrn Prof. Dr. K. Thomas zu seinem 70. Geburtstag, am 28. November 1953, in Verehrung gewidmet.

Nähe des Asymmetriezentrums bedeuten, wobei hier nicht diskutiert werden soll, ob die nicht-ionenaktiven Netzmittel nicht doch infolge ihrer Ionogenität wirken (Kling).

Immunisierungsversuche am Kaninchen.

Herstellung der Lösungen.

1. Rinderalbumin: Das von den Behring-Werken erhältliche Rinderserumalbumin wurde 10%ig (g/ml) in Wasser gelöst und mindestens 12 Std im Eisraum stehen gelassen.

2. Rinderalbumin-Netzmittel: Albumin und Alkylpolyäthylenoxyd („Sch 600") als nicht molekulardestilliertes Produkt werden eingewogen und sofort mit Wasser bei Zimmertemperatur ohne Schwierigkeiten im Verlauf von etwa ½ Std gelöst, so daß die Endlösung 10% Albumin und 1% „Sch 600" enthielt, und mindestens 12 Std bei 0° stehen gelassen.

3. Menschliches Serum: durch Zentrifugieren von spontan in 12 Std gewonnenem Blut (A_2rh), 12 Std bei 0° stehen gelassen.

4. Serum-Netzmittel-Gemisch: Ein Teil des Serums wird mit Netzmittel versetzt, so daß im Endergebnis 1% Netzmittel im Serum gelöst ist. Dann wird es 12 Std bei 0° stehen gelassen.

12 Kaninchen (2500—3500 g) erhalten als gleichmäßige Trockenkost Hafer und Trinkwasser. Sie werden in 4 Gruppen zu je 3 Tieren eingeteilt, die folgendermaßen behandelt werden:

Erste Gruppe (mit Albumin) (Vers.-Nr. 60, 61 u. 62): bekommt innerhalb von 10 Tagen in ansteigenden Dosen insgesamt 4,5 ml 10%ige wäßrige Rinderserumalbuminlösung intravenös.

Zweite Gruppe (mit Albumin) (63, 64, 65): desgleichen nach Zusatz von 1% „Sch 600" (Lösung 2).

Dritte Gruppe (mit Serum) (71, 72, 73): Innerhalb von 1—7 Tagen insgesamt je 4,5 ml menschliches Blutserum.

Vierte Gruppe (mit Serum) (74, 75, 76): mit Zusatz von 1% „Sch 600" (Lösung 4).

Die Injektionen wurden gut vertragen. Nach 4—6 Wochen wurde den Tieren aus der Ohrvene Blut entnommen und mit dem Serum Präzipitinreaktionen durchgeführt (Tab. 1). Wir kamen ohne Entbluten der Tiere aus, da wir Mikroreagensgläser verwandten, wie sie von Boyd angegeben wurden.

Pro Reagensglas wurde etwa 0,04 ml unverdünnten Kaninchenserums aus dem Ohr mit dem mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnten (1:10 bis 1:10000) Antigen überschichtet. Die Lösung mit 10% Albumin und 1% Netzmittel wurde wie zur Immunisierung hergestellt und kurz vor der Präzipitinreaktion mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. An der Berührungsstelle bildete sich bei positivem Ausfall ein Präzipitatring.

Diskussion.

Man sieht aus Tab. 1, daß nur die Kaninchen 60, 62, 63, 71, 72, 73, 74, 75, 76, vielleicht 72, aber nicht 61, 64 und 65 mit dieser Methode immunisierbar gegen Rinderalbumin und gegen menschliches Serum werden. Die schlechte Antigenbildung dieser Tiere hat mit dem Netzmittel nichts zu tun. Es zeigt sich außerdem, daß die verwendeten

Alkylpolyäthylenoxydäther keinen Einfluß auf die Immunisierungsvorgänge hatten. Sie verändern die Eiweißkörper nicht, wenn man sie ihnen vor der Verwendung zur Immunisierung beimischte und zum Ausgleich von Polymerisations- und Depolymerisationsvorgängen mindestens 12 Std vor Gebrauch mit dem Eiweißkörper stehen ließ. Die Titer sind gleich hoch, doch die Immunisierung war in beiden Fällen etwa gleich geblieben.

Tabelle 1. *Antigenverdünnungen.*

Vorbehandlung	Vers.-Nr.	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:10	1:100	1:1000	1:10000
		10% Rinderalbumin				10% Rinderalbumin + 1% „Sch 600"			
1. Gruppe Albumin	60	+	+	±	—	+	+	±	—
	61	—	—	—	—	—	—	—	—
	62	+	+	+	—	+	+	+	—
2. Gruppe Albumin + Sch	63	+	+	—	—	+	+	—	—
	64	—	—	—	—	—	—	—	—
	65	—	—	—	—	—	—	—	—
		menschliches Serum				menschl. Ser. + 1% „Sch 600"			
3. Gruppe Serum	71	+	+	—	—	+	+	±	—
	72	±	—	—	—	±	—	—	—
	73	+	+	—	—	+	+	—	—
4. Gruppe Serum + Sch	74	+	+	—	—	+	+	—	—
	75	+	+	—	—	+	±	—	—
	76	+	+	+	—	+	+	+	—

Ferner schützten die Alkylpolyäthylenoxydäther die Eiweißkörper nicht vor der gegenseitigen Präzipitation, obwohl die molare Menge an Netzmitteln recht groß ist. Aus den Konzentrationen und dem N-Gehalt läßt sich errechnen, daß mit annähernd 90% der überwiegende Teil der im Eiweiß vorhandenen Aminosäuren ein Netzmittelmolekül zur Verfügung hatte. Weder reagierte das Serum der mit Netzmittel-Eiweiß immunisierten Tiere irgendwie stärker mit angebotenem Netzmittel-Eiweiß als die netzmittelfreien Kontrollen, noch reagierte es schwächer, was bedeutet, daß in dieser Versuchsanordnung Netzmittel eine Präzipitin-Reaktion nicht aufzuheben vermögen.

Einfluß von Netzmitteln auf die optische Aktivität.

Albumin dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. Das uns zur Verfügung stehende Präparat war ein Serumalbumin vom Rind (Behring-Werke) und hatte folgende Eigenschaften:

Stickstoff (Kjeldahl): 15,81% (Trockengewicht); Trockengewicht: 97—98%; Isoelektrischer Punkt bei $p_H = 4{,}8$; Molekulargewicht: 69000; Drehung: $a_D^{21,5°} = -1{,}100°$ ($l = 200$ mm; $c = 1\%$ (g/ml) lufttrocken; ohne Unterschied ob in Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung gelöst; $[a]_D^{21,5°} = -55{,}0°$.

Das in schönen faserigen Brocken vorhandene Präparat hatte mit jeder Einwaage eine erstaunlich abweichende spezifische Drehung; die Versuche wurden mit einem einheitlich durchpulverisierten Vorrat ausgeführt, dessen Lösungen konstant drehten. Es wurden verschiedene Netzmittel zu der Lösung gegeben. In der Tab. 2 sind die Endkonzentrationen an Albumin wie an Netzmitteln angegeben,

Tabelle 2.

Albumin in %	Zusatz	%	Verhältnis: Mole Netzmittel / Mole Albumin	p_H der Endlösung	$[a]_D^{25}$
1	—	—	—	6,70	—54,6°
0,1	—	—	—	—	—76,0°
0,01	—	—	—	—	—90°
1	NaOH 1n	1n	—	11,10	—65,6°
1	H_2SO_4 1n	1n	—	1,0	—51,5°
—	Q 746	1	—	4,43	±0°
1	Q 746	1	160	6,23	—63,7°
—	Na-LS	1	—	6,11	±0°
1	Na-LS	1	230	7,05	—58,8°
—	Sch 600	1	—	5,83	±0°
1	Sch 600	1	115 ± 30	6,13	—50,9°
—	Krz 9	1	—	3,19	±0°
1	Krz 9	1	180 ± 35	5,26	—55,5°
—	Krz 35	1	—	3,16	±0°
1	Krz 35	1	180 ± 35	5,20	—55,6°
—	Krz 85	1	—	6,80	±0°
1	Krz 85	1	145 ± 30	9,43	—52,9°

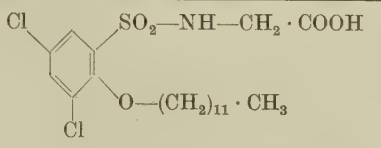
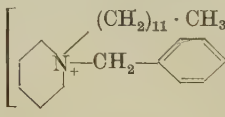
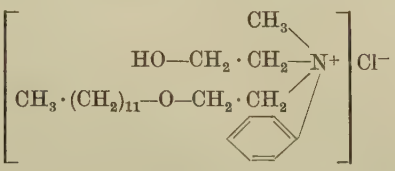
sie betrugen meist 1%. Außer den nichtionenaktiven wurden vergleichsweise auch verschiedene an- und kationen-aktive Netzmittel verwendet. Die Netzmittel selber sind nicht optisch aktiv.

Diskussion.

Das pulverisierte Serumalbumin zeigte in der verhältnismäßig langen Zeit, die zum Lösen nötig war, keine erkennbare Mutarotation. Seine spezifische Drehung ist sehr stark konzentrationsabhängig. In der verwendeten Lösung hatte das Serumalbumin eine spezifische Drehung von $[a]_D^{25} = -54{,}6°$. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration innerhalb von einigen p_H Einheiten ist sehr gering, erst durch Zusatz von Lauge wird die negative Drehung um einige Grade verstärkt, durch Zusatz von Säure abgeschwächt. Versuche mit Licht von 546 nm ergaben keine wesentlich anderen Ergebnisse; für die Bestimmung der Rotationsdispersion werden wir eine andere Apparatur verwenden. Natriumlaurylsulfat als anionogenes und Quartamon (Q 746) als kationogenes Netzmittel verstärken die Linksdrehung ebenfalls. Die gleichsinnige Veränderung ist bemerkenswert, da die Netzmittel nach den Untersuchungen

von Jerchel dem Eiweißmolekül entgegengesetzte Ladung erteilen. Alkylpolyäthylenoxyd schwächt die Linksdrehung ab, hat also eine positivierende Wirkung. Die Verbindungen Krz 85, Krz 9 und Krz 35, die nach Kimmig hochwirksame Medikamente sind, verändern die Drehung nur unwesentlich.

Tabelle 3.

$[\alpha]_D^{25}$	pH	Bezeichnung	
—50,9°	6,13	„Sch 600"	
—51,5°	1 n H_2SO_4	—	
—52,9°	9,43	Krz 85	
—54,6°	6,70	1% Albumin, in Wasser gelöst, ohne Zusätze	
—55,5°	5,26	Krz 9	
—55,6°	5,2	Krz 35	
—58,8°	7,5	Na-LS	
—63,7°	6,23	Q 746	
—65,6°	1 n NaOH	—	

Zusammenfassung.

Im Zusammenhang mit dem geringen Einfluß, den Alkylpolyäthylenoxydäther auf physikalisch-chemische und kolloide Eigenschaften der Eiweißkörper haben, wurden weitere Eigenschaften untersucht.

Mit Immunitätsreaktionen läßt sich keine Veränderung am Eiweiß nachweisen. Serumalbumin und Serum selbst haben in Gegenwart von Alkylpolyäthylenoxyd dieselbe Antigenwirkung wie allein. Die gebildeten Antikörper haben dieselben Präzipitinreaktionen. Alkylpolyäthylenoxyd hat auch keinen Einfluß auf Empfindlichkeit und Ausfall der Präzipitinreaktionen.

Alkylpolyäthylenoxydäther senkt die spezifische Drehung von Serumalbumin; stark polare Verbindungen wie Quartamon und Laurylsulfat erhöhen sie, während einige hochwirksame antimykotische Stoffe (Kimmig) auf die Drehung sehr wenig Einfluß haben.

Wir danken Herrn Prof. Dr. Dr. J. Kimmig für die freundliche Überlassung der Substanzen Krz 9, 35, 85, der Fa. Schülke u. Mayr GmbH., Hamburg, für die Überlassung von Q 746, der Fa. Elida-Werk, Hamburg, für die Überlassung von Natrium-Laurylsulfat.

Literatur.

Boyd, W. C.: „Fundamentals of Immunology", Interscience Publ., Inc., New York, 2. Aufl. 1947, S. 420. Brand, E., u. Mitarb.: Amer. J. chem. Soc. **72**, 3314 (1950); **73**, 3508 (1951); **73**, 3510 (1951); **73**, 4025 (1951); **73**, 1027 (1951). — Brand, E.: Sur la rotation optique des peptides; 2. Congr. Internat. de Biochim., Paris, Compte rendu, S. 151, Masson u. Cie. 1953. — Breusch, F. L., u. H. Bodur: Z. physiol. Chem. **286**, 148 (1950). — Breusch, F. L., u. S. Hersek: Z. physiol. Chem. **291**, 1 (1950). — Breusch, F. L., u. E. Ulusoy: Z. physiol. Chem. **286**, 160 (1950). — Friend, J. A.: Nature **168**, 910 (1951). — Jerchel D.: Angew. Chem. **64**, 626 (1952). — Kimmig, J.: pers. Mitteilung. — Kling, W.: Angew. Chem. **65**, 201 (1953). — Klingmüller, V., u. W. Schroeder: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 215 (1953). — Schmidt, K. H.: Z. physiol. Chem. **277**, 117 (1943). — Schroeder, W.: Ber. ges. Physiol. **154**, 298 (1953). — Soehring, K., u. Th. Nasemann: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 96 (1952).

Doz. Dr. Dr. V. Klingmüller und Dr. W. Schroeder, Hamburg 20, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 251—254 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Über Bromderivate des Pentaerythrits.

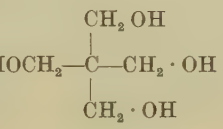
Von

W. Heubner und W. Hertzsch*.

(Eingegangen am 14. April 1953.)

Vor mehr als 4 Jahrzehnten hat Ernst Frey in die damals bekannten Daten über das Verhalten des Bromids Ordnung gebracht und seine langdauernde Remanenz auf die Gesetzmäßigkeit zurückführen können, daß die Niere gleiche Äquivalente Chlorid und Bromid nicht zu unterscheiden vermag; er hat diese Erkenntnis auch gegen spätere Einwände erfolgreich zu verteidigen gewußt (1932). Sie begegnet Jedem von neuem, der sich mit dem Verhalten bromhaltiger Substanzen im Organismus beschäftigt.

Zwei bromhaltige Derivate stellte die Firma J. D. Riedel-E. de Haën aus Pentaerythrit



her, in dem drei Hydroxylgruppen durch Brom ersetzt waren, nämlich den einfachen Alkohol Pentatribromhydrin oder Tribrom-trimethyläthanol und das entsprechende Säureamid (Tribrom-trimethylacetamid); über das letztgenannte hat bereits Hillecke Untersuchungen angestellt.

Diese Substanz wirkte an Mäusen in Dosen zwischen 0,013 und 0,016 je Kilogramm sedativ, an Ratten über 0,1 g narkotisch, mit 1,0 g tödlich. Demgegenüber war mit dem Alkohol in gleichen Dosen und selbst solchen bis zu 2 g je Kilogramm an Ratten kein sichtbarer Effekt zu erzielen. Auch in Bezug auf die Abspaltung von Brom verhielten sich beide Substanzen verschieden, wie aus Analysen der Ausscheidungen auf Brom und im Harn, überdies aus gesonderter Bestimmung des anorganischen und organischen Broms klar ersichtlich war.

Die Methode der Brombestimmung war die gleiche, wie sie Hillecke angegeben hat, also grundsätzlich nach Leipert, jedoch mit gewissen Verbesserungen. Außer der von Hillecke vorgeschlagenen Form der Vorlage fanden wir die Einschaltung eines Hahnes vor der Saugvorrichtung nützlich, um die Geschwindigkeit des — bromfrei gewaschenen! — Luftstromes durch die Apparatur zu regulieren. Zum Zutropfen von 5 cm³ Harn in das Veraschungsgefäß gebrauchten wir 15 min (um eine zu schnelle Gasentwicklung hintan zu halten); zum Nachspülen verwendeten wir 5 cm³ einer 3½%igen Kaliumchloridlösung, die aus „bromfreiem Kaliumchlorid" der Firma *Merck* nach nochmaligem Umkristallisieren hergestellt war;

* Herrn Prof. Ernst Frey in Freiburg zum 75. Geburtstag gewidmet.

Leerwertbestimmungen ergaben, daß mit der angewandten Menge dieses Chlorids weniger als 0,005 mg Br zugeführt wurde. Diese Größe liegt an der Grenze des beschriebenen analytischen Verfahrens. Der Zusatz des Chlorids erwies sich als erforderlich, um im Verlauf des Analysengangs die Bildung einer ausreichenden Menge von Hypochlorit — zur Oxydation des Bromids zu Bromat — sicherzustellen. Auch der Zufluß dieser Chloridlösung hat sehr langsam zu erfolgen, um die Bildung einer zu großen Menge des flüchtigen Chromylchlorids zu vermeiden, daß dann unter Umständen in die Vorlage gelangen könnte. — Wichtig ist ferner, daß an den Wänden des Weges zwischen Veraschungsgefäß und Vorlage keine Wassertröpfchen niedergeschlagen werden; sie können elementares Brom lösen und damit dem Übergang in die Vorlage und der quantitativen Erfassung entziehen.

Die Trennung von anorganischem Brom vom organischen erfolgte durch Silberfällung; der Niederschlag wurde auf einem kleinen Porzellanfiltertiegel gesammelt und dieser auf einem Glaskreuz in das entsprechend geräumige Veraschungsgefäß gestellt; Luftstrom und Tropftrichterspitze mündeten in das Tiegelchen hinein. Im Filtrat des Silberniederschlages (und Waschwassers) erfolgte nach Veraschung die Bestimmung des organischen Broms.

Kontrollanalysen von Gemischen aus Adalin (Bromdiäthylazetylharnstoff) und Kaliumbromid lieferten folgende Zahlen:

	organisch ← mg Brom → anorganisch			
	berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
I.	0,835	0,830	0,525	0,520
II.	0,555	0,545	0,735	0,730
III.	0,215	0,210	0,245	0,240

Die normale Bromausscheidung betrug bei hafergefütterten Ratten 0,03—0,04 mg Br je Tag. Bei fleischgefütterten Tieren waren die Zahlen etwa 3mal so hoch. Vom Gesamtbetrag kamen auf den Kot 0,01—0,02 mg bei Hafer-, etwa das Doppelte bei Fleischkost. (Ausführlichere Daten finden sich in den Dissertationen von Hillecke und Hertzsch.)

Die bromhaltigen Derivate des Pentaerythrits wurden in Dosen von 6—7 mg in öliger Lösung durch Schlundsonde gegeben (vergleichsweise auch Adalin zu etwa 15 mg); die applizierte Brommenge betrug stets nahezu 5 mg. In jedem Einzelfall wurde jedoch die Dosierung sehr sorgfältig gemessen.

Die gefundenen Werte für die Ausscheidung der zugeführten Substanzen in unveränderter Form gibt Tab. 1 summarisch wieder.

Tabelle 1. *In organischer Form im Harn ausgeschiedenes Brom als Prozente der eingegebenen Menge.*

	Pentatribrom-hydrin	Tribromtri-methylazetamid	Adalin
binnen 24 Std.	85—87	14—27	10—11
binnen 5 Tagen	87—93	33—34	12—16

Am anorganischen Bromid waren die Unterschiede — entsprechend dem Gesetz von Frey — weniger ausgesprochen, immerhin deutlich erkennbar, wie Tab. 2 zeigt.

Schon vom 5. Tage an sanken also die Bromidwerte nach Zufuhr des Alkohols auf die normalen Werte, während sie nach den beiden anderen Substanzen noch am 10. Tage das 2—3fache der Norm betrugen.

Tabelle 2. *Ausscheidung von anorganischem Bromid im Harn in µg nach*

	Pentatribrom-hydrin	Tribromtri-methylazetamid	Adalin
am 1. Tag	55	35	20
am 3. Tag	30	25	30
am 5. Tag	10	30	40
am 8.—10. Tag im Mittel	12	31	29

Von einigen hafergefütterten Ratten wurden am 5. Tag nach Zufuhr von 30 mg des Acetamids, also 21 mg Br je Kilogramm Blut (durch Herzpunktion), Leber, Niere und Hirn entnommen und im Vergleich zu normalen Kontrollorganen verascht und auf Brom analysiert. Die Befunde gibt Tab. 3.

Tabelle 3. *mg % Br in Organen und nach Zufuhr von Tribromtrimethylazetamid.*

	Normal	Vorbehandelt	
Blut	2—3	6,2	8
Leber	0,8—1,0	1,7	1,9
Nieren	0,8—1,0	3,0	3,3
Hirn	0,8—1,2	1,8	2,3

Die gefundenen Zahlen führen zu dem Schluß, daß das Pentatribromhydrin zum größten Teile rasch unverändert ausgeschieden wird, das entsprechende Säureamid jedoch bald partiell gespalten wird, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie Adalin, dessen relativ rasche Zersetzung schon lange bekannt ist (Impens). Sucht man eine Erklärung für die Unterschiede im Verhalten der beiden ähnlich gebauten Substanzen, so könnte man vermuten, daß eine rasche ester- oder glykosidartige Bindung des Alkohols und Überführung in eine Glukuronsäure, also in einen Elektrolyten, ihn der innigeren Berührung mit den bromabspaltenden Fermentsystemen entzieht, vor allem aber auch rasch in den Harn ableitet.

Qualitative Proben im Harn der mit dem Bromhydrin gefütterten Ratten ergaben in der Tat mit Naphthoresorcin eine verstärkte Reaktion auf Glukuronsäure. Offenbar verhält sich also das Tribromtrimethyläthanol völlig analog dem Tribromäthanol Avertin (Welsch).

Zusammenfassung.

Von zwei Substanzen mit gleichartiger Bindung von Brom an endständige Methylgruppen, nämlich Tribromtrimethyläthanol und Tribromtrimethylacetamid, wird die erste im Organismus der Ratte kaum

angegriffen und rasch nahezu vollständig ausgeschieden, die zweite dagegen etwas langsamer eliminiert und zu mehr als der Hälfte zersetzt. Zur Deutung des Unterschieds wird an rasche Kuppelung des Alkohols zu gepaarter Glukuronsäure gedacht.

Literatur.

Frey, E.: Z. exper. Path. u. Ther. 8, 29 (1910). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **163**, 392, 399 (1932). — Hertszch, W.: Über die Ausscheidung zweier bromhaltiger Verbindungen. Inaug. Diss. nat.-math. Berlin: Freie Universität 1953. — Hillecke, N.: Untersuchungen über ein bromhaltiges Säureamid. Inaug. Diss. med. Berlin: Freie Universität 1951. — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 174 (1951). — Impens: Ther. Gegenw. **1912**, 158. — Leipert, Th., u. O. Watzlawek: Z. physiol. Chem. **226**, 108 (1934). — Welsch, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **139**, 302 (1929).

Prof. Dr. W. Heubner, Berlin-Zehlendorf-West, Goethestr. 46.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 255—263 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn.
(Direktor: Professor Dr. Dr. W. Schulemann).

Elektromyographische Wertbestimmung von neuromuskulär lähmenden Stoffen am Tier.

Von
A. Basold und **H. F. Zipf.**

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. April 1953.)

Bei der tierexperimentellen Prüfung von muskellähmenden Pharmaka können eine große Reihe verschiedenartigster Untersuchungsmethoden angewandt werden. Unter Außerachtlassung des praktischen Testwertes, auf den wir unten noch zurückkommen, wollen wir sie in folgendem zusammenstellen. Es kann ein Präparat geprüft werden:

1. am isolierten Muskelpräparat gegenüber antagonistisch wirksamen Stoffen;
2. am isolierten Nerv-Muskelpräparat;
3. am Masseterpräparat der Ratte (Eichholtz, Hotovy und Erdniss);
4. am „natürlich innervierten" Zwerchfellstreifen in vitro;
5. am natürlich innervierten Zwerchfell in situ;
6. am wachen, nicht vorbehandelten ganzen Tier;
7. am indirekt gereizten Muskel des narkotisierten Ganztiers;
8. am wachen, cerebral krampferregten Ganztier;
9. gegenüber der parathyreopriven Tetanie;
10. gegenüber der Muskelrigidität des dezerebrierten Tieres (Hartridge und West).

Zu 1. Hierzu kann der isolierte *M. rectus abdominis* (Garcia de Chalon) oder der *M. sartorius des Frosches* verwendet werden. Von den Säugetiermuskeln ist das isolierte *Zwerchfellpräparat der Ratte* geeignet (Gemmil). So läßt sich z. B. eine Gegenwirkung von Curare gegenüber der Azetylcholinkontraktion des Muskels nachweisen.

Zu 2. Es sind verschiedene isolierte Nervenmuskelpräparate vorgeschlagen worden, für Kaltblüter das Ischiadicus-Sartoriuspräparat (Ing und Wright, Ing und Cowan) oder das *Ischiadicus-Gastrocnemiuspräparat des Frosches* (siehe Ther, S. 435). Eine neuere Modifikation mit fortlaufender Durchströmung der isolierten Froschschenkel durch O_2-gesättigte Ringer-Lösung und mit alternierender Reizung vom Nerven her oder am Muskel direkt ist von (Raaflaub und Wilbrandt) beschrieben worden. Für Säugetiere existiert das *Phrenicus-Zwerchfellpräparat* der Ratte (Bülbring, Bülbring und Chou). Gegenüber dem Rattenpräparat tritt das schon früher von Botazzi angegebene Phrenicus-Zwerchfellpräparat des Hundes wegen der schlechteren Diffusionsverhältnisse zurück. In allen Fällen wird vom Nerven aus elektrisch gereizt. Modifikationen der Elektroden finden sich bei Mogey, Trevan und Young, sowie bei Soehring.

Zu 3. Hier handelt es sich schon um einen natürlich ernährten Muskel, den M. masseter der Ratte, der elektrisch zu rhythmischen Kaubewegungen gereizt wird (Eichholtz, Hotovy und Erdniss).

Zu 4. Nachdem schon Thomas und Franke einen *Zwerchfellstreifen* vom Hund außerhalb des Tieres *„in vitro“, aber doch in seinem natürlichen Zusammenhang mit dem* im Tier verbliebenen *N. phrenicus* untersucht hatte, und von Lehman später eine Modifikation dieser Methode für Katzen angegeben wurde, gelang es Eichholtz und Taugner, dieses Verfahren auch an der *Ratte* anzuwenden. Bei dem dünnen Zwerchfellmuskel der Ratte reichte, im Gegensatz zu den dicken Muskeln größerer Tiere, die O_2-Diffusion zur Aufrechterhaltung der Funktion über mehrere Stunden aus.

Zu 5. Ob wir die *Zwerchfell*-bewegung mit den Augen feststellen, von den oberen Atemwegen oder vom Bauchraum, bzw. direkt vom Zwerchfell aus registrieren, oder die Muskelaktionsströme des sich kontrahierenden Zwerchfells von diesem direkt oder von der Haut aus aufnehmen, immer handelt es sich um die Prüfung des betreffenden Stoffes an einem *natürlich innervierten* Muskel in situ. Ergänzend zu den Muskelaktionsströmen des Zwerchfells können gleichzeitig die diesem zufließenden Aktionsströme des N. phrenicus aufgezeichnet werden (Frey, Göpfert und Raule).

Zu 6. a) Als praktisch gut anwendbares Verfahren erwies sich die *„Head-drop-methode“* von Holaday am Kaninchen (siehe bei Varney, Sinegar und Holaday), auch am Meerschweinchen. Schon das vorausgehende *„Herabsinken der Ohren“* ist als Zeichen der beginnenden Curarewirkung zu werten, beobachtet von Boehm und zum Curaretest besonders herangezogen von Cheymol. Ein nachfolgendes intensives Stadium der Muskellähmung gibt sich in einer starken *„Erschlaffung der Bauchmuskulatur“* zu erkennen, besonders dann, wenn das Kaninchen auf ein barrenartiges Gerüst aufgelegt wird (siehe z. B. bei Bovet, sowie bei Bovet und Viaud). Zu den Methoden am unbehandelten Tier gehört auch die Kontrolle der *Stellreflexe bei Mäusen*, die zwangsweise in einem *rotierenden Zylinder* laufen (Young und Lewis) oder sich auf einer *schiefen Ebene* befinden. Bei diesen beiden letzten Testverfahren können größere Tierzahlen auf einmal eingesetzt werden.

b) In einem weiteren Verfahren leitete man durch eingestochene Nadelelektroden die *Muskelaktionsströme* von *wachen Versuchstieren* (Meerschweinchen, Kaninchen, Hund) ab (Körner und Ihlenfeldt). Die eingetretene Curarewirkung wurde durch Kneifen von der Haut aus geprüft.

Zu 7. Auch hier liegen eine ganze Reihe von Einzelmethoden vor. Zunächst einmal wurde von verschiedener Seite die bekannte *Methode von* Claude Bernard *am Frosch* durch eine Perfusion der Bauchmuskulatur von der Aorta aus modifiziert (Raaflaub, Schneider und Stötter). Sie wurde schließlich auf die Verhältnisse des Säugetiers übertragen. Verschiedene *Säugetiermuskeln* sind unter Belassung ihrer natürlichen Lage, Blutversorgung und Innervation, nach mehr oder weniger großer operativer Vorbereitung, vom Nerven aus elektrisch reizbar, so z. B. der M. gastrocnemicus vom N. ischiadicus, der M. tibialis vom N. ischiadicus (Brown), das Zwerchfell vom N. phrenicus, die äußeren Augenmuskeln vom N. oculomotorius (bzw. N. trochlearis) aus (Hoffmann und Lembeck). Auch die Taube erwies sich für die indirekte Gastrocnemicusreizung als geeignet (Ginzel, Klupp und Werner). Die Registrierung der Muskelkontraktion erfolgt meist mechanisch, wobei neben dem indirekten, alternierend auch der direkte Reizerfolg aufgezeichnet werden kann. Neben der intravenösen kann die intraarterielle, muskelnahe Injektion angewandt werden, mit dem Vorteil, daß kleinere Dosen muskellähmender Stoffe als wirksam erkannt werden.

Zu 8. Gelegentlich werden Muskelrelaxantien auch an wachen Versuchstieren geprüft, die durch Pharmaka oder physikalische Reize auf zentralem Wege zu

erhöhtem Muskeltonus und Krampfanfällen erregt werden. Dies gilt für die *Unterdrückung des durch Morphin bedingten* Straubschen *Mäuseschwanzphänomens* (Pick und Richards), *der Cardiazol- oder Pikrotoxinkrämpfe* oder des *Elektrokrampfes* (siehe Methode von Tainter und Mitarb.), z. B. bei Kaninchen oder Ratten.

Zu 10. Den beiden letztgenannten Verfahren kommt bezüglich ihres Wertes als Testmethoden keine Bedeutung zu.

Zur Austestung der muskelerschlaffenden Wirkung eines Stoffes gehört:

I. Die Festlegung der *Schwellendosis*, bei der die *partielle Wirkung* beginnt.

II. Die Ermittlung der *total lähmenden Dosis.*

III. Die Bestimmung der sogenannten *Erschlaffungsdosis*, die *innerhalb des Bereiches der partiellen Lähmung* liegt und den praktischen Bedürfnissen des Chirurgen Rechnung trägt, d. h. ihm einen direkten Anhalt für seine Dosierungen gibt.

IV. Mit Hilfe dieser Werte können dann eine Reihe von Quotienten aufgestellt werden, die einen Vergleich der einzelnen Muskelrelaxantien hinsichtlich ihrer therapeutischen Brauchbarkeit und Giftigkeit ermöglichen, z. B. das Verhältnis von atemlähmender Dosis zu partiellähmender und totallähmender Dosis (*Lähmungsquotient* nach Günzel, Klupp und Werner (2)) bzw. zur Erschlaffungsdosis (Head-drop-Dosis). Darüber hinaus kann besonders für die Bedürfnisse des Chirurgen, den der Lähmungsquotient nicht so sehr interessiert, da er den Patienten künstlich beatmet, der sogenannte „*Nebenwirkungsquotient*" bestimmt werden. Hierbei ermittelt man die tödliche Dosis am künstlich beatmeten Hund oder der Katze im Hinblick auf die tödlichen Kreislauf-, Ganglienwirkungen usw., und setzt sie in das Verhältnis zur atemlähmenden Dosis.

Betrachtet man von diesen Gesichtspunkten aus die praktisch verwertbaren Testverfahren, so findet man lediglich unter 6. und 7. Methoden, die die Schwellendosis am Beginn des Bereiches der partiellen Lähmung oder die Erschlaffungsdosis innerhalb dieses Bereiches bestimmen lassen. Diesen Methoden haftet aber der Nachteil an, daß sie nur mit blutigen Eingriffen durchgeführt werden können, und die Tiere deshalb nur einmal für den Versuch verwendet werden können. Für die Feststellung der Erschlaffungsdosis ist am gebräuchlichsten der einfache Head-drop-Test am Kaninchen. Er entspricht am weitgehendsten den Forderungen unter III. Die unter 6 b angeführte Methode würde den Forderungen, die für I und II gelten, entsprechen, sofern es möglich wäre, den völlig undefinierten Reiz des Kneifens durch einen wohldefinierten zu ersetzen. Ein Messen der Stärke der partiellen Lähmung durch Integrieren der Muskelaktionsströme, wie dies von Körner und Ihlenfeld durchgeführt wurde, erscheint aus physikalischen Gründen unstatthaft. Unser Bestreben ging also dahin, einen Test zu entwickeln, der unblutig arbeitete und bequemer war, als die unter 7. angeführten Säugetiermethoden, und eine einwandfreie Bestimmung der partiellähmenden und totallähmenden Schwellendosis ermöglichte. Dann war auch die Berechnung der verschiedenen Indices gesichert.

Es erschien uns naheliegend, einen Test auf der Basis *elektrischer Reizung der motorischen Nerven* und der *Registrierung der ausgelösten Muskelaktionsströme am unversehrten, künstlich beatmeten* Ganztier zu

entwickeln. Die elektrische Reizung ließ den Vorteil einer genauen willkürlich einstellbaren Reizdosierung, die Registrierung der Muskelaktionsströme den Vorzug einer höheren Empfindlichkeit erwarten. Während einer künstlichen Beatmung (nach Art der intratrachealen Narkose und Beatmung beim Menschen) konnte der Versuch unblutig durchgeführt werden, und die Tiere waren mehrmals verwendbar. Von einem Test auf dieser Basis erwarteten wir die Erfüllung der Forderungen hinsichtlich I und II, so daß sich, nach Ergänzung durch den Head-drop-Test, ein gutes Bild von der muskellähmenden Wirkung eines Stoffes ergeben mußte.

Der Verwirklichung eines solchen Verfahrens stand jedoch die Schwierigkeit entgegen, der massiv auftretenden Reizeinbrüche Herr zu werden. Reizeinbrüche dieser Art lassen sich am unverletzten Tier nicht umgehen, da die durch die Haut eingestochenen Reizelektroden lediglich in die Nähe des zu reizenden motorischen Nerven zu liegen kommen. Dabei ist ein Auftreten von intensiven Stromschleifen über den ganzen Tierkörper hin unvermeidlich.

Bei kleineren Versuchstieren, etwa beim Kaninchen, und bei Verwendung beispielsweise des Plexus brachialis als motorischen Nerv und Ableitung der Muskelaktionsströme vom M. bizeps muß mit einem Verhältnis von Aktionspotential zu Reizeinbruchspotential von bis zu 1 : 1000 gerechnet werden. Selbst gute Differentialverstärker zur Verstärkung der Aktionspotentiale vermögen solche Spannungsverhältnisse nicht ohne Übersteuerung aufzunehmen. Diese vermindert die Empfindlichkeit stark und verändert den Frequenzgang des Verstärkers. Normalerweise hat dies zur Folge, daß durch den veränderten Frequenzgang der Reizeinbruchsimpuls sehr stark verlängert wird, und es dadurch im Verstärker zu einer Überlagerung von Reizeinbruch und Aktionsstrom kommt. Durch die Übersteuerung des Verstärkers durch den Reizeinbruch wird dieser aber so unempfindlich, daß das überlagerte Aktionspotential am Verstärkerausgang nicht mehr auffindbar ist.

Die Verhältnisse am Menschen liegen weitaus günstiger, da bei der weiten Entfernung von Reizstellen und Muskelableitung der Reizeinbruch durch Erdung recht gut vermieden werden kann. Aus diesem Grunde konnten Churchill, Davidson und Richardson (1952) mit einem Verfahren, das dem unsrigen ähnlich ist, die elektrische Aktivität der indirekt gereizten Hypothenarmuskeln am Menschen unter Dekamethoniumjodid zeigen. Lediglich Burns und Paton arbeiteten ebenfalls mit einem elektromyographischen Verfahren am Tier (Katze). Sie präparierten hierbei in der bisherigen blutigen Weise sowohl Nerv als auch den M. gracilis, ein Verfahren, das gegenüber der mechanischen Registrierung keinen Vorteil bietet.

Wir umgingen diese Schwierigkeiten

1. Durch Verwendung von sehr kurzen Reizen von etwa 0,8 msec Dauer.

2. Durch Benutzung eines Verstärkers mit einer sehr wirksamen Differentialschaltung und einer relativ hohen oberen Grenzfrequenz.

Reizdauer	0,8 msec
Reizeinbruchsdauer am Verstärkerausgang einschließlich Ein- und Ausschwingvorgang	1,2 msec
Überleitungszeit	2,2 msec
Pause zwischen Reizeinbruch und Aktionsstrom	1,0 msec

Da nun bei Reizung des Plexus brachialis und Aktionsstromabnahme am M. bizeps beim Kaninchen die Erregung etwa *1,5—2,5 msec* braucht, um von der Reizstelle den Nerven entlang bis zum Muskel zu gelangen, ist selbst bei Übersteuerung des Verstärkers auch am Verstärkerausgang der Reizeinbruch bereits abgelaufen, bevor der Muskelaktionsstrom auftritt, so daß letzterer nun ungestört verstärkt werden kann. Auf dem zur Anzeige benutzten Schirm des Kathodenstrahloszillographen erscheinen also Reizeinbruch und Aktionspotential räumlich getrennt. Ein Beispiel hierfür zeigt Abb. 1.

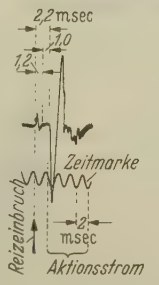


Abb. 1. Zeitliche Beziehungen zwischen Reizdauer, Reizeinbruchsdauer, Reizüberleitungszeit und Muskelaktionsstrom bei indirekter, elektr. Muskelreizung vom Halsplexus des Kaninchens aus.

Im folgenden soll unsere Versuchsanordnung im einzelnen beschrieben werden:

Tierart. Unsere Methode ist geeignet für Kaninchen, Katzen und Hunde. Wir wählten bisher als Versuchstiere Kaninchen.

Narkose. Zur Ausschaltung von Spontanmuskelerregungen und zur Intubierung zwecks künstlicher Beatmung ist eine Narkotisierung der Tiere erforderlich. Unter Anpassung an die Verhältnisse in der chirurgisch-klinischen Praxis wurde nach einer *Einleitungsnarkose* mit Evipan oder sonst einem geeigneten Kurznarkotikum intubiert und künstlich beatmet. Die Einführung eines *Gummikatheters als Trachealsonde* erfolgte bei den Kaninchen mittels eines Kinder-laryngoskops. Die Narkose wurde durch *Lachgas* fortgesetzt. Eine *Dauernarkose* mit Urethan erwies sich bei Kaninchen ebenfalls als sehr gut geeignet.

Künstliche Beatmung. Sie erfolgte durch eine *Starlingpumpe.* Sie erwies sich als sehr wichtig, da sich nur durch eine gleichmäßige Beatmung die bekannte Abhängigkeit der Curarewirkung von der Belüftung vermeiden ließ. Durch ihre Unterbrechung konnte stichprobenweise auf eine eventuell atemlähmende Wirkung kontrolliert werden.

Indirekte Nervenreizung. Am Versuchstier lassen sich mehrere periphere Nerven ausfindig machen, die von der Haut aus durch Einstechen von Elektroden elektrisch gereizt werden können. Wir wählten den *Halsplexus* des Kaninchens. Durch Palpieren stellten wir den Winkel zwischen Trachea und 1. Rippe fest. Die Elektroden wurden dort senkrecht in die Haut etwa 1—2 cm tief eingestochen. Nun wird bei eingeschaltetem Reizgerät der motorische Nerv z. B. des M. bizeps aufgesucht. Wird er gefunden, so treten kräftige Zuckungen des Muskels auf. Zum Aufsuchen stellt man zweckmäßig eine hohe Reizstärke ein, und vermindert sie nach dem Auffinden

unter leichten Lagekorrekturen auf unter 2 mA, um direkte Muskelreizungen mit Sicherheit zu vermeiden. Bei dieser Reizstärke muß eine kräftige Muskelzuckung zustande kommen. Anschließend werden die Reizelektroden durch eine entsprechende Halterung fixiert.

Ableitung der Muskelaktionsströme. Sie erfolgt durch Einstechen von Nadelelektroden in den gereizten Muskel.

Elektroden. Wir verwendeten Doppelelektroden, die aus V 2-Injektionskanülen der Stärke 16 hergestellt worden waren. Der Elektrodenabstand betrug etwa 2,5 mm und wird durch Einbettung der 2 Nadeln am stumpfen Ende in eine isolierende

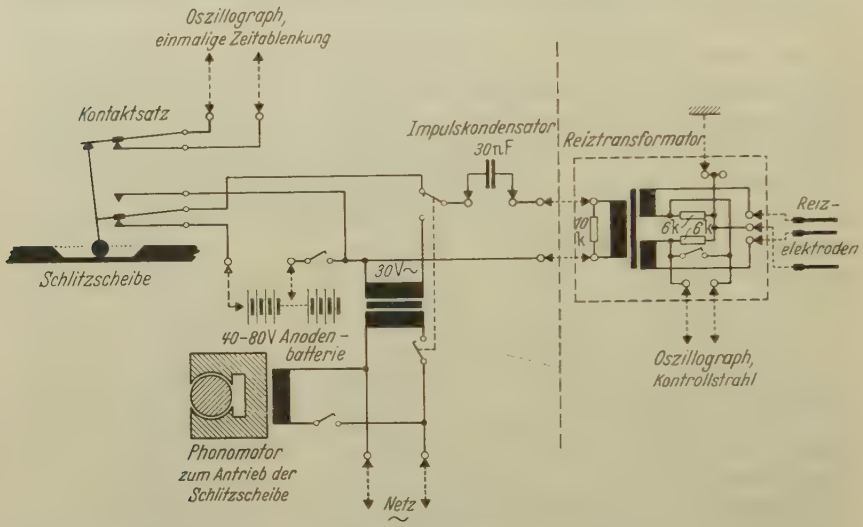


Abb. 2. Reizgerät.

Kunststoffmasse festgelegt. Außerdem benutzten wir eine Einzel-Nadelelektrode zur Erdung des Tieres. (Sie wurde in der Nähe des Brustbeins unter die Haut eingestochen.)

Reizgerät. Soll ein solches den vorliegenden Bedingungen entsprechen, so muß es einige besondere Forderungen erfüllen:

1. Aus den oben angedeuteten Gründen muß die Dauer der einzelnen Reizimpulse zwischen 0,5 und 1,0 msec liegen.

2. Die Reizfrequenz muß sehr niedrig gehalten werden, da die Blockadewirkung von Curare-ähnlichen Stoffen gegenüber den Reizen mit steigender Reizfrequenz stark zunimmt. Man muß also eine Reizfrequenz wählen, deren Wirkung gegenüber dem unter Curareeinfluß stehenden Muskel den physiologischen Erregungen entspricht. Dies ist der Fall bei Reizfrequenzen von 0,1—0,5 Hz.

Rein elektronisch arbeitende Anordnungen sind unter diesen Umständen nur mit verhältnismäßig großem Aufwand zur einwandfreien Funktion zu bringen. Geeignet sind selbstverständlich auch käufliche Markengeräte. Wir entschlossen uns, aus Gründen der Billigkeit, zum Aufbau eines halbmechanisch arbeitenden Reizgerätes, bei dem die Reizimpulse durch Öffnen und Schließen eines mechanisch betätigten Relaiskontaktes entstehen. Über diesen Relaiskontakt wird abwechselnd von einer Batterie her ein Kondensator geladen und entladen. Seine Lade- und Entladestromstöße werden zur Verminderung von Reizeinbrüchen über einen Transformator als Reizimpulse dem Reizobjekt zugeführt. Die mechanische

Betätigung des Relaiskontaktes erfolgt durch eine Scheibe mit mehreren Kreisen von Schlitzen, die regelmäßig von Stegen unterbrochen werden. Jeder Kreis hat eine andere Anzahl von Schlitzen, so daß bei gleichbleibender Scheibendrehzahl je nach dem Schlitzkreis, auf dem der Relaiskontaktsatz läuft, verschiedene Reizfrequenzen entstehen. Die Schlitzscheibe wird mit Reibradantrieb von einem Phonomotor getrieben. Um die auf dem Schirm des zur Anzeige benutzten Kathodenstrahloszillographen entstehenden Aktionsstrombilder leicht photographieren zu können, wird durch die Schlitzscheibe mit etwa 1/100 sec Vorlauf vor dem Reizkontakt ein Kontakt betätigt, der am Kathodenstrahloszillographen Einzelzeitablenkungen

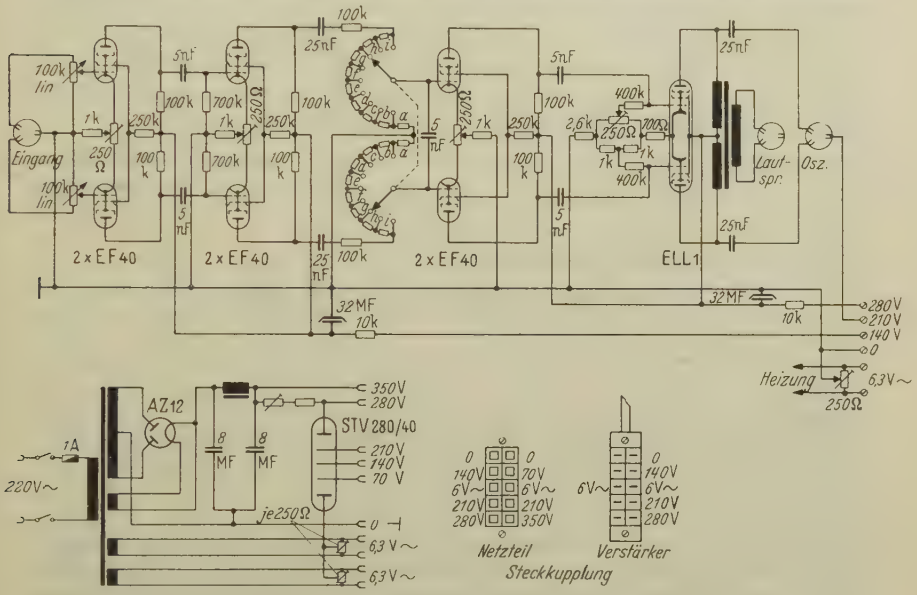


Abb. 3. Impulsverstärker (Prof. Schmitz, Mühlheim/Ruhr).

steuert. Dadurch wird erreicht, daß jede Reizaktionsstromperiode an dem einen Schirmrand beginnt und bei richtiger Einstellung der Kippfrequenz am anderen Schirmrand endet. Der Ausgang des Gerätes weist insofern eine Besonderheit auf, als in Serie zu den Reizelektroden noch zwei 6 K Ohm Widerstände liegen. Diese Widerstände bewirkten weitgehende Unabhängigkeit des Reizstroms vom Gewebswiderstand. Darüber hinaus kann mit der an diesen Widerständen abfallenden Spannung ein 2. Oszillograph ohne Vorverstärker gesteuert werden. Damit ist es möglich, direkt im Reizkreis den Reizstrom laufend zu messen. Darüber hinaus enthält das Reizgerät noch einen kleinen Netztransformator, der die Netzspannung auf etwa 30 V heruntersetzt und eine galvanische Trennung seiner Sekundärspannung vom Netz herbeiführt. Diese Spannung kann nun durch Betätigen eines Schalters dem Tier als Reizspannung zugeführt werden. In dieser Schaltung ist es erheblich leichter, den Verstärker auf optimale Kompensation des Reizeinbruchs einzustellen, als mit den normalen, seltenen Reizen. Nachdem die richtige Kompensationseinstellung des Verstärkers erreicht ist, wird wieder auf normale Reize zurückgeschaltet. Die Schaltung des Reizgerätes geht aus Abb. 2 hervor.

Verstärker. Zur Verstärkung der Muskelaktionsströme benutzten wir einen Verstärker von Prof. Schmitz, Mülheim/Ruhr. Besonders hervorzuheben ist an

diesem Gerät die außerordentlich *hohe Kompensationsfähigkeit unsymmetrischer Eingangsspannungen* (z. B. Störspannungen wie Reizeinbruch usw.), und die *hohe obere Grenzfrequenz*. In Abb. 3 wird mit dem Einverständnis von Herrn Prof. Dr. Schmitz das *Schaltbild des Verstärkers* gezeigt. Die in der Abb. 3 mit a - i bezeichneten Widerstände besitzen, der gleichen Reihenfolge nach, folgende Größen: 3, 5, 11, 15, 20, 25, 35, 35, 55 K Ω,

Kathodenstrahloszillograph. Zweistrahloszillograph ohne eingebauten Vorverstärker. Der eine Strahl wird zur Darstellung der Aktionsströme benutzt, der andere als Kontrollstrahl zur Messung der Reizströme im Reizkreis oder zum Schreiben

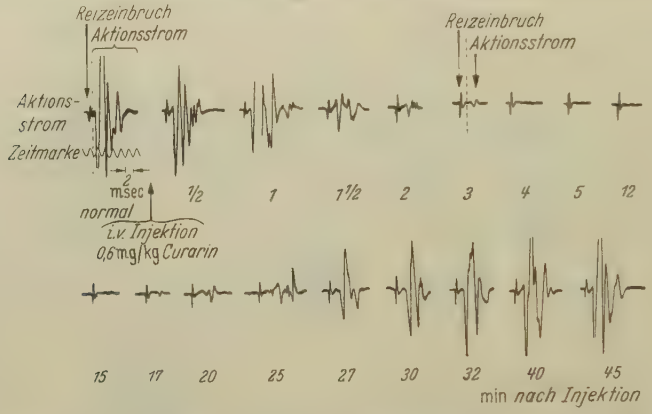


Abb. 4. Zeitlicher Ablauf der neuro-muskulär lähmenden Wirkung von 0,6 mg/kg d-Tubo-Curarin intravenös am M.biceps des Kaninchens. Urethannarkose. Trachealkatheter. Künstliche Beatmung. Indirekte, elektrische Reizung vom Halsplexus aus. Verschwinden und Wiedererscheinen des Muskelaktionsstromes.

einer Zeitmarke. Ein entsprechender Zweistrahloszillograph ist in „Funkschau" Heft 1, S. 18 (1950) beschrieben, so daß sich hier eine weitere Beschreibung erübrigt.

In Abb. 4 ist der photographisch registrierte Verlauf eines Versuches mit d-Tubo-Curarin (Asta) wiedergegeben.

Wir geben vergleichsweise mit den aufgefundenen Literaturwerten die durch unser Verfahren ermittelten Grenzwerte für d-Tubo-Curarin (Asta).

	partiell lähmende Dosis mg/Kg i. v.		total lähmende Dosis mg/Kg i. v.	
	eigene Werte	Literatur-Werte	eigene Werte	Literatur-Werte
d-Tubo-Curarin	0,1	0,12—0,15	0,6	0,3—0,5

Die Übereinstimmung ist durchaus befriedigend. Die beschriebene Methode bietet den Vorteil, daß der eintretende Effekt an den abnehmenden Aktionsströmen schon zu einer Zeit erkennbar ist, in der an der Extremitätenzuckung noch nichts festgestellt werden kann. Umgekehrt zeigt sich auch die wiederkehrende Muskelaktion im Aktions-

strombild so frühzeitig, daß die gereizte Extremitätenmuskulatur für das beobachtende Auge noch völlig ruht.

Zusammenfassung.

Zur Wertbestimmung von neuro-muskulär-lähmenden Stoffen am narkotisierten, intubierten und künstlich beatmeten ganzen Tier (Kaninchen und Katzen) wurde eine elektromyographische Methode entwickelt. Dabei werden bestimmte Muskelgebiete indirekt und vom Nerven her elektrisch gereizt, und der einwirkende Reizimpuls sowie die abgeleiteten Muskelaktionsströme auf dem Leuchtschirm eines Kathodenstrahloszillographen zeitlich getrennt dargestellt. Der Beginn der partiellen und der Zeitpunkt der totalen Muskellähmung sowie das Wiedererscheinen der Muskelerregbarkeit können an der Größe und Form der Muskelaktionsströme genau verfolgt und photographiert werden. Die Methode ist unblutig und erlaubt eine wiederholte Verwendung der Tiere.

Literatur.

Boehm, R.: Heffters Hdb. exper. Pharmakologie, Bd. II/1, S. 179. Berlin: Springer 1920. — Bottazzi, F.: Zbl. Physiol. **21**, 171 (1907). — Bovet, D.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **54**, 407 (1951). — Bovet, D., et P. Viaud: Anesth. et analg., Paris **8**, Nr. 2 (1951). — Brown, G. L.: J. of Physiol. **92**, 220 (1938). — Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — Bülbring, E., and T. C. Chou: Brit. J. Pharmacol. **2**, 8 (1947). — Burns, B. D., and W. D. M. Paton: J. of Physiol. **115**. 41 (1951). — Cheymol, J.: Curares naturels et curares de synthése. Actualités pharmacologiques de R. Hazard. Paris: Masson et Cie., **1**, 1 (1949). — Churchill-Davidson and A. T. Richardson: Proc. roy. Soc. Med. **45**, 179 (1952). — Eichholtz, Fr., u. R. Taugner: Pflügers Arch. **254**, 267 (1951). — Eichholtz, Fr., R. Hotovy u. H. Erdniss: Arch. internat. Pharmacodynamie **80**, 62 (1949). — Frey, R., H. Göpfert u. W. Raule: Anaesthesist **1**, 2, 33 (1952). — Garcia de Chalon, P. D.: Quart. J. Pharmacy. London **20**, 28 (1947). — Gemmil, C. L.: Johns Hopkins Hosp. Bull. **66**, 232 (1940). — Ginzel, K. H., H. Klupp u. G. Werner (1): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 453 (1951). — Ginzel, K. H., H. Klupp u. G. Werner (2): Sci. pharmaceut., Wien Jg. 19, 164 (1951). — Hartridge, M., et R. West: Brain **54**, 312 (1931). — Hofmann, H., u. F. Lembeck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 552 (1952). — Ing, H. R., and S. L. Cowan: J. of Physiol. **82**, 432 (1934). — Ing, H. R., and Wright: Proc. roy. Soc. B. **109**, 337 (1931). — Körner, Fr., u. G. Ihlenfeldt: Ärztl. Forschg. **6**, 265 (1952). — Lehman, A. J.: J. of Pharmacol. **60**, 69 (1937). — Mogey, G. A., J. W. Trevan and P. A. Young: Analyt. **74**, 884 (1949). — Pick, E. P., and G. V. Richards: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **67**, 329 (1948). — Raaflaub, J.: Inaug. diss. Basel 1950. — Raaflaub, J., u. W. Wilbrandt: Helvet. Physiol. Acta **8**, 44 (1950). — Schneider, H. H., u. G. Stötter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 153 (1950). — Soehring, Kl.: Arch. internat. Pharmacodynamie **9**, 365 (.952). — Tainter, M. L., E. G. Tainter, W. Sherwood Lawrence, E. N. Neuru, R. W. Lackey, F. P. Luduena, H. B. Kirtland and R. J. Gonzalez: J. of Pharmacol. **97**, 229 (1949). — Thier, L.: Pharmakolog. Methoden. Stuttgart: Wiss. Verl.ges. **1949**. — Thomas, J. E., and F. E. Franke: J. of Pharmacol. **34**, 111 (1928). — Varney, Linegar and Holaday: Fed. Proc. **7**, 261 (1948). — Young, D. M., and Lewis: Ccience (Lancaster, Pa.) **105**, 368 (1947).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Pharmakol. Inst. der Universität Bonn, Reuterstr. 2b.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 264—267 (1953).

Aus dem Physiologischen Institut zu Leipzig
(Direktor: Professor Dr. med. E. Bauereisen).

Die osmotische Resistenzkurve der vitalgranulierten Erythrocyten.

Von
H. Gerbstädt und G. Kotulek.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. April 1953.)

Eine Untersuchung der osmotischen Resistenzkurve der Erythrocyten hatte gezeigt, daß diese als Summenlinie einer statistischen Verteilung aufzufassen und mithin ein Ausdruck der biologischen Variabilität der Erythrocyten hinsichtlich ihrer osmotischen Resistenz ist (Gerbstädt). Die Resistenzwerte der Erythrocyten werden demnach durch eine Vielzahl von Veränderlichen bestimmt und nicht einfach durch deren Alter. Das Erythrocytenalter könnte nur einer von vielen resistenzbeeinflussenden Faktoren sein. Die im Sinne einer Altersabhängigkeit der osmotischen Resistenz gedeuteten Befunde früherer Autoren haben jedoch keine Beweiskraft (Gerbstädt).

Es liegt nahe, einen solchen Beweis auf die bekannte Erscheinung zu gründen, daß die Vitalgranulierten bei der osmotischen Hämolyse mit zunehmendem Hämolysegrad angereichert werden, also eine höhere osmotische Resistenz besitzen als die reifen Erythrocyten. Hierfür muß zunächst bekannt sein, wie sich die Resistenzwerte der Vitalgranulierten im einzelnen zu denen der Erythrocyten verhalten, ob sie sämtlich darüber liegen oder ob die Resistenzbereiche beider Zellgruppen sich überschneiden. Auf Grund der erwähnten eigenen Versuchsergebnisse wurde angenommen, daß auch die Resistenzwerte der Vitalgranulierten sich wie die der Erythrocyten einer Variationskurve folgend um ein Häufigkeitsmaximum verteilen. Diese Annahme wurde in folgender Weise experimentell geprüft:

Methodik.

Als Versuchsobjekt war Kaninchenblut wegen seines verhältnismäßig hohen Gehaltes an Vitalgranulierten geeignet. Das aus der Carotis entnommene Blut wurde in einer gleich großen Menge einer Lösung aufgefangen, die aus einem Teil 3,8%iger Natriumcitrat-Lösung und vier Teilen 1%iger Natriumchlorid-Lösung bestand. Die Erythrocyten wurden abzentrifugiert, das obere Drittel des Sediments in isotonischer NaCl-Lösung suspendiert und erneut zentrifugiert. Von dem zuletzt erhaltenen Sediment wurde wiederum das obere Drittel gewonnen und zur Herstellung einer 50%igen Erythrocyten-Aufschwemmung verwendet, die als Stammsuspension diente. Durch dieses Verfahren (Komiya) wurden die Vitalgranulierten angereichert.

Je 1 cm³ dieser Stammsuspension wurde gleichen Mengen (10 cm³) einer Reihe von NaCl-Lösungen zugesetzt, deren Salzkonzentration zwischen 1 und 0,4% lag. Im Bereich von 0,6—0,4% betrug das Konzentrationsintervall dieser Lösungen 0,01%. Die Suspensionen blieben 30 min auf einer Schüttelmaschine, die unter gleichen mechanischen Bedingungen in schonender Weise ein Sedimentieren der Erythrocyten verhinderte. Nach Entnahme einer Probe zur Zählung der intakt gebliebenen Erythrocyten wurden die Suspensionen zentrifugiert und die überstehende Lösung soweit entfernt, daß das verbleibende Volumen dem des Sediments gleichkam. Dieser Rest wurde mit einem Glasstab gut durchmischt und ein Tropfen davon auf einem vorbereiteten Objektträger ausgestrichen. Die Färbung erfolgte nach dem von Schilling angegebenen Verfahren. Von jeder Konzentrationsstufe wurden zwei Ausstriche angefertigt.

Zum Auszählen der Ausstriche dienten in Ermangelung eines Ehrlichschen Okulars zwei gleiche Kompensationsokulare mit verschiedenen Okularblenden, deren Öffnungsverhältnis 1:9,74 betrug. Da in Ausstrichen aus hypotonischen Suspensionen nur die intakten Vitalgranulierten gezählt werden sollten, war zu beachten, daß auch die Substantia reticulofilamentosa der hämolysierten Zellen bei der „Vitalfärbung" den Farbstoff annimmt. Die Färbbarkeit ist also kein Kennzeichen der unversehrten Zelle. Die Erythrocytenzählungen konnten wegen der großen Zahl der gleichzeitig zu untersuchenden Proben nicht unmittelbar erfolgen. Deshalb wurden Mikrophotographien der gefüllten Zählkammern angefertigt, deren Positive bei etwa 150facher Gesamtvergrößerung ein Auszählen der ganzen Kammer gestatteten. Zur Vermeidung von Fehlern wurde jede gezählte Zelle mit Hilfe einer Metallnadel markiert, welche das Positiv der Zählkammeraufnahme durchbohrend einen Stromkreis schloß. Ein elektromagnetisches Zählwerk zeigte das Ergebnis an. Einzelheiten der Methodik sind an anderer Stelle beschrieben (Gerbstädt u. Schmerso).

Ergebnisse.

Aus den gewonnenen Zahlen wurde für jede Suspension die Anzahl der nicht hämolysierten Vitalgranulierten berechnet. Diese beträgt in Prozent des für die isotonische Lösung gültigen Wertes:

$$P_a = \frac{100\ E_1 \cdot V_a \cdot N_a}{E_a \cdot V_1 \cdot N_1}$$

Es bedeuten: E = Anzahl der im Ausstrich gezählten Erythrocyten. V = Anzahl der im Ausstrich gezählten Vitalgranulierten. N = In der Zählkammer bestimmte Erythrocytenzahl. Die Indices bezeichnen die Salzkonzentration der jeweiligen Suspension, der Index 1 kennzeichnet also die in isotonischer Lösung bestimmten Werte.

Abb. 1 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuches. Die Anzahl der intakten Zellen ist als Funktion der Salzkonzentration des Suspensionsmittels dargestellt. Für die Vitalgranulierten ergibt sich eine prinzipiell gleichartige S-förmige Resistenzkurve wie für die Erythrocyten, die im Bereiche niedrigerer Salzkonzentrationen liegt. Die Vitalgranulierten sind nicht durchweg die resistentesten Erythrocyten. Ihre mittlere osmotische Resistenz ist höher als die der Gesamtpopulation, im einzelnen streuen ihre Resistenzwerte jedoch in weitem Bereich, indem sie sich um

ein Häufigkeitsmaximum verteilen. Dies zeigen die Kurven der Abb. 2. Sie stellen die Differenzenquotienten der in Abb. 1 wiedergegebenen Kurven dar, d. h. die Anzahl der Formelemente je Resistenzklasse als Funktion der Salzkonzentration. (Zu einer Resistenzklasse sind hier jeweils die Zellen zusammengefaßt, die innerhalb des geprüften Konzentrationsintervalls von 0,01% hämolysieren.)

Für die Beurteilung dieses Ergebnisses ist es wesentlich, daß die Vitalgranulierten, verglichen mit der gesamten Erythrocyten-Population, Zellen gleichen Alters sind. (Ihre Reifungszeit beträgt etwa einen Tag, die Erythrocytenlebensdauer 120 Tage.) Wie die Resistenzkurve der Vitalgranulierten beweist, haben Zellen gleichen Alters sehr unterschiedliche Resistenzwerte. Diese Schlußfolgerung hatte sich bereits aus der oben erwähnten Untersuchung der osmotischen Resistenzkurve der Erythrocyten ergeben (Gerbstädt). Das Erythrocytenalter könnte hiernach höchstens einer von vielen resistenzbeeinflussenden Faktoren sein. Es bleibt also die Frage zu erörtern, ob die höhere mittlere osmotische Resistenz der Vitalgranulierten in diesem Sinne zu deuten ist. Allein gestattet dieser Befund nicht die Annahme einer Altersabhängigkeit der osmotischen Resistenz; denn die Vitalgranulierten unterscheiden sich ja von den reifen Erythrocyten nicht nur durch das Alter. Es ist möglich, daß sie beim Reifungsvorgang mit den übrigen sie kennzeichnenden Eigenschaften auch ihre osmotische Resistenz verlieren und die des reifen Erythrocyten annehmen, während altersbedingte Resistenzunterschiede unter den reifen Erythrocyten nicht vorhanden sind. Für diese Auffassung spricht nun ein Vergleich der beiden in Abb. 2 dargestellten Variationskurven: Im Falle eines Alterseinflusses hätte die osmotische Resistenz einer Erythrocytenpopulation eine größere Streuung als die einer aus ihr herausgegriffenen Gruppe von Zellen gleichen Alters. Die Kurven der Abb. 2 lassen aber keinen solchen Unterschied im Streuungsmaß erkennen. Nach den mitgeteilten Versuchsergebnissen zu urteilen

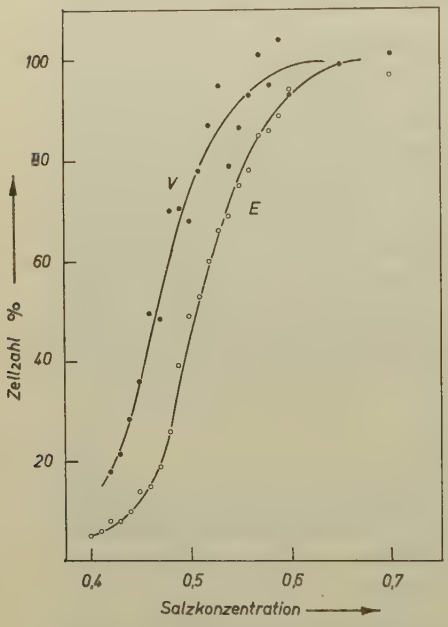


Abb. 1. Resistenzkurve einer Erythrocyten-Population (*E*) und Resistenzkurve ihrer Vitalgranulierten (*V*). Abszissen: NaCl-Konzentration des Suspensionsmittels in Prozent. Ordinaten: Zellzahlen in Prozent der in isotonischer Lösung gefundenen.

ist also die osmotische Resistenz der reifen Erythrocyten von ihrem Alter unabhängig.

Bei der Untersuchung der Ausstriche der Hämolysesedimente fanden sich mit dem Hämolysegrad zunehmende Mengen von stäbchen-, keulen- oder hantelförmigen Gebilden, die nach Größe, Form und Färbbarkeit als Elemente bzw. Bruchstücke der Substantia granulofilamentosa anzu-

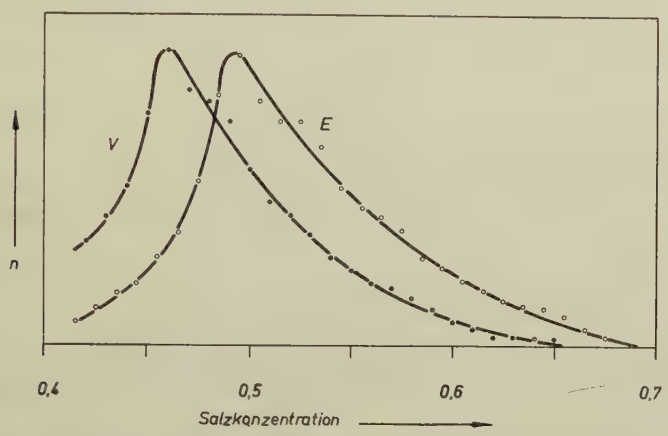


Abb. 2. Variationskurven der osmotischen Resistenz-Werte einer Erythrocyten-Population (*E*) und ihrer Vitalgranulierten (*V*). Abszissen: NaCl-Konzentration des Suspensionsmittels in Prozent. Ordinaten: Relative Zellzahl je Resistenzklasse.

sehen waren. Deren Färbbarkeit bei der „Vitalfärbung" bleibt also auch nach der Stromatolyse erhalten.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Bestimmung der osmotischen Resistenzkurve der vitalgranulierten Erythrocyten beschrieben. Diese ist — wie die der Erythrocyten — die Summenlinie einer statistischen Verteilung. Ein Vergleich der Resistenzkurve der Erythrocyten mit der Resistenzkurve der Vitalgranulierten zeigt, daß die osmotische Resistenz der reifen Erythrocyten von ihrem Alter unabhängig ist.

Literatur.

Gerbstädt: Z. Biol. **105**, 301 (1952); weitere Literatur siehe dort. — Gerbstädt u. Schmerso: Z. Biol. **106**, 63 (1953). — Komiya: Münch. med. Wschr. **1926**, 1835.

Dr. H. Gerbstädt, Physiol. Inst. d. Univ. Leipzig.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 268—289 (1953).

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

Über die Herzwirkung eines Chinoxalinderivates im Vergleich zu g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure.

Von

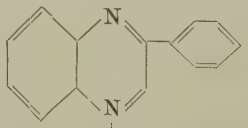
J. Tripod, W. Schuler und R. Meier.

Mit 15 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. April 1953.)

Neben den mit den Herzglykosiden aus der Digitalis- bzw. Strophanthingruppe gezeitigten Ergebnissen wurden in den letzten Jahren verschiedene Befunde erbracht, wonach auch gewisse einfachere Stoffe, z. B. Angelikalaktone oder Stoffe der Bufotalingruppe sowie gewisse „thiolopriv wirkende" Pharmaka und andere Fermentgifte, charakteristische Wirkungen auf den Herzmuskel auszuüben vermögen. Obwohl allerdings keiner der letztgenannten Stoffe eine therapeutische Bedeutung gewonnen hat, zeigen diese Befunde doch, daß es möglich ist, mit anderen chemischen Stofftypen gewisse tonisierende Herzwirkungen zu erhalten. Zwar ist es noch nicht gelungen, in verschiedenen abgewandelten chemischen Gruppen derartige „digitalisähnliche" und therapeutisch brauchbare Wirkstoffe zu finden, doch haben wir in unseren systematischen Serienuntersuchungen eine Gruppe neuer chemischer Verbindungen entdeckt, welche eine eigenartige tonisierende Wirkung auf den Herzmuskel ausüben. Es schien uns daher nicht uninteressant, diese tonisierende Wirkung tierexperimentell näher zu untersuchen und mit derjenigen anderer Herzgifte zu vergleichen, worüber in dieser Arbeit ausführlich berichtet sei.

Diese neuartigen synthetischen Stoffe sind Chinoxalinderivate und wurden von Druey und Hüni[9] hergestellt. Obwohl eine große Anzahl dieser Verbindungen eine ausgesprochene tonisierende Wirkung am Kalt- und Warmblüterherzen zeigt, seien hier nur die typischen Herzwirkungen des wirksamsten Vertreters erwähnt, nämlich des als Nr. 11072 bezeichneten 1-(β-Diäthylamino-äthyl)-3-phenyl-chinoxalin-dihydrochlorids von folgender Konstitutionsformel:



Als Vergleichspräparate dienten g-Strophanthin (Merck) und Cristafolin[28] — ein neues hochwirksames Digitalispräparat mit 60% Digitoxin

und 40% Gitoxin in reiner Form. Die eigenartige Herzwirkung von Nr. 11072 wurde unter folgenden Gesichtspunkten untersucht: Wirkung am isolierten Kalt- und Warmblüterherzen sowie am Frosch- und am

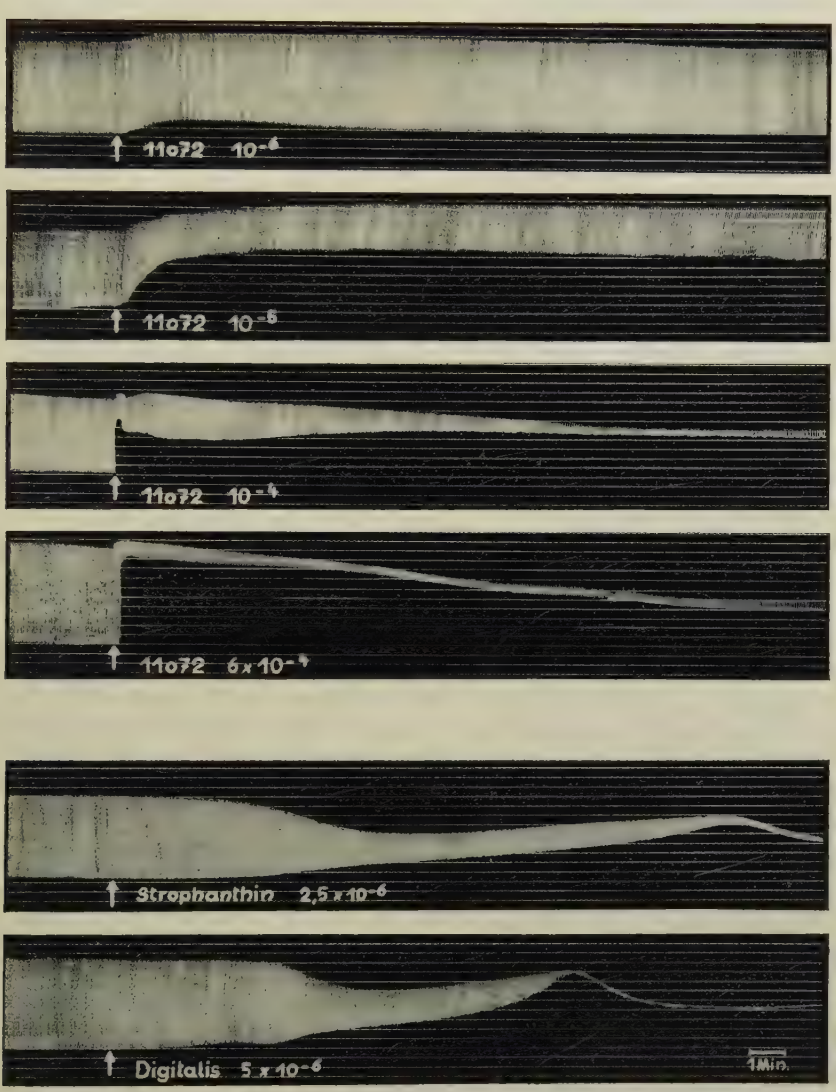


Abb. 1. Isoliertes Froschherz. Wirkung verschiedener Konzentrationen von Nr. 11072 im Vergleich zu g-Strophanthin und Digitalis (Cristafolin).

Warmblüterherzen in situ. Fernen haben wir zur näheren Charakterisierung der pharmakologischen Verhältnisse zwischen Nr. 11072, den Herzglykosiden und den thiolopriven Fermentgiften folgende Prüfungen

vorgenommen: Wirkung auf die Atmung und die anaerobe Glykolyse des Herzmuskels; Beeinflussung der Herzwirkung durch Ca-Mangel und durch Hypodynamie am isolierten Froschherzen, durch Anoxämie am Warmblüterherzen, durch Cu^{++} am Kalt- und Warmblüterherzen und schließlich durch Cystein am Kaltblüterherzen.

1. Wirkung am isolierten Kalt- und Warmblüterherzen.

Am *isolierten Froschherzen* (R. temporaria) erzeugt Nr. 11072 schon in niederen Endkonzentrationen von 10^{-7} bis 3×10^{-7} einen positiv inotropen Effekt mit gleichzeitiger Hebung des Fußpunktes. Bei höheren

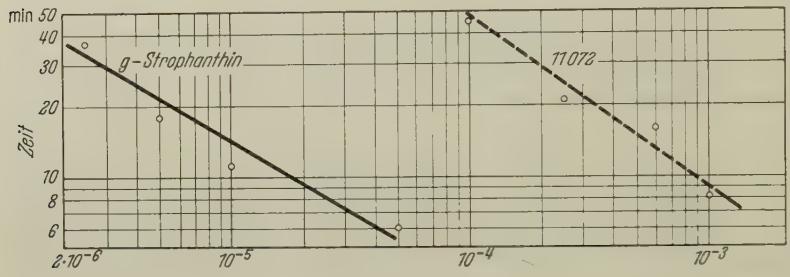


Abb. 2. Dosis/Wirkungskurve des systolischen Stillstandes am isolierten Froschherzen. Bilogarithmische Koordinaten.

Konzentrationen wird diese positive Tonotropie verstärkt, und in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-3} tritt eine eigenartige systolische Einstellung bis zum systolischen Stillstand ein (Abb. 1).

Obwohl diese Herzwirkung durch eine positive Inotropie mit systolischem Stillstand gekennzeichnet ist, sind doch deutliche qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Herzwirkungen der Abb. 1 vorhanden. Zunächst ist die Wirkung niederer und mittlerer Konzentrationen von Nr. 11072 gut auswaschbar, d. h. reversibel, im Gegensatz zu derjenigen der Herzglykoside. Erst bei hohen Konzentrationen ist sie im allgemeinen irreversibel. Ferner tritt die positive Tonotropie sofort nach Zugabe von Nr. 11072 auf, während sich die spezifische Herzwirkung von Digitalis und Strophanthin erst nach einer bestimmten Latenzzeit zeigt. Der Typus der Herzkurve nach dem Chinoxalinderivat weist somit einen sehr steilen Anstieg auf, wobei es nicht möglich ist anzugeben, ob andere Diffusionsverhältnisse dafür verantwortlich sind. Schließlich sei erwähnt, daß Nr. 11072 etwa 50mal weniger wirksam ist als g-Strophanthin (Abb. 2), wie aus der Bestimmung der Latenzzeit bis zum systolischen Stillstand hervorgeht. Dabei wurde der systolische Stillstand bzw. die mit 90%iger Amplitudenabnahme verbundene systolische Tonisierung wie üblich als ungefähres Maß der Wirsamkeit verwendet[19, 30].

Unter Verwendung der in unseren Laboratorien ausgearbeiteten LANGENDORFF-Apparatur [24, 33, 34] wurde die Wirkung von Nr. 11072 am *isolierten Warmblüterherzen* mit gleichzeitiger Registrierung des Coronardurchflusses, der Herzfrequenz und der Amplitude der Herzkontraktionen untersucht. Sowohl an der Katze als auch am Kaninchen erzeugt das Chinoxalinderivat schon in niederen Konzentrationen eine Verkleinerung der Amplitude mit ausgesprochener systolischer Einstellung. Diese Wirkung ist bis in hohe Dosen gut reversibel, im Gegensatz zum charakteristischen Effekt von g-Strophanthin, Cristafolin und auch Monojodessigsäure, welche alle einen irreversiblen systolischen Stillstand hervorrufen (Abb. 3).

An diesem Testorgan ist Nr. 11072 in bezug auf die systolische Einstellung etwa 10—20 mal weniger wirksam als g-Strophanthin. Die Coronargefäße zeigen nach Präparat Nr. 11072 je nach Tierart eine schwache Erweiterung bzw. Verengerung. Diese Gefäßwirkung wird weder durch Antihistaminika, noch durch Parasympathicolytika oder Sympathicolytika antagonistisch beeinflußt. Möglicherweise handelt es sich dabei um Änderungen, welche auf Dehnungszustände der Herzmuskulatur zurückzuführen sind und nicht auf eine reine Gefäßwirkung.

Wenn somit Nr. 11072 eine ausgesprochene, je nach Tierart und Konzentration gut reversible positive Tonotropie an Kalt- und Warmblüterherzen ausübt, ist es jedoch bemerkenswert, daß Nr. 11072 bis zu hohen Konzentrationen keine erregende bzw. tonisierende Wirkung auf andere isolierte

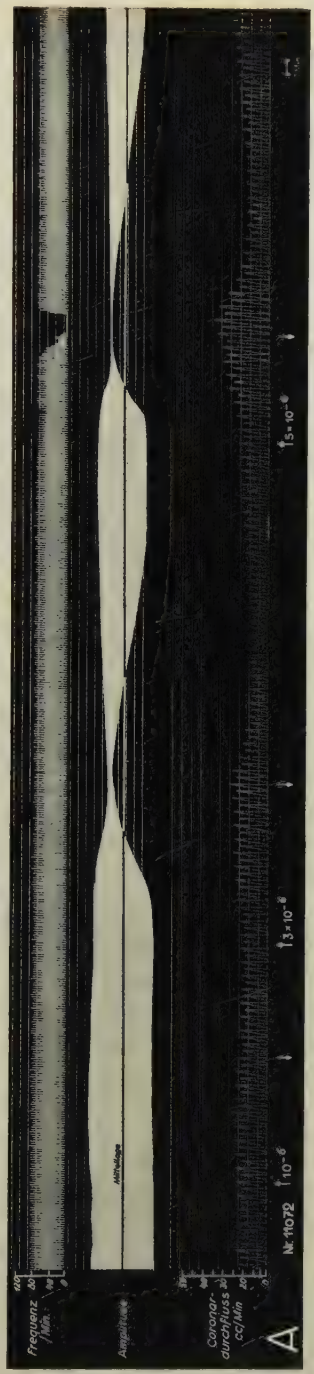


Abb. 3 *A—C*. Isoliertes Kaninchenherz nach LANGENDORFF. — *A* Reversible Wirkung steigender Konzentrationen von Nr. 11072.

Organe ausübt: die Spontantätigkeit des isolierten Kaninchendarmes wird bei einer Konzentration von 10^{-5} gelähmt, der isolierte Uterus und die isolierte Samenblase des Meerschweinchens, sowie die isolierten Gefäße der Hinterextremitäten des Kaninchens werden bis zu einer Konzentration von 10^{-5} gar nicht beeinflußt. *Die am isolierten Herzen beobachtete tonisierende Wirkung von Präparat Nr. 11072 ist somit aus-*

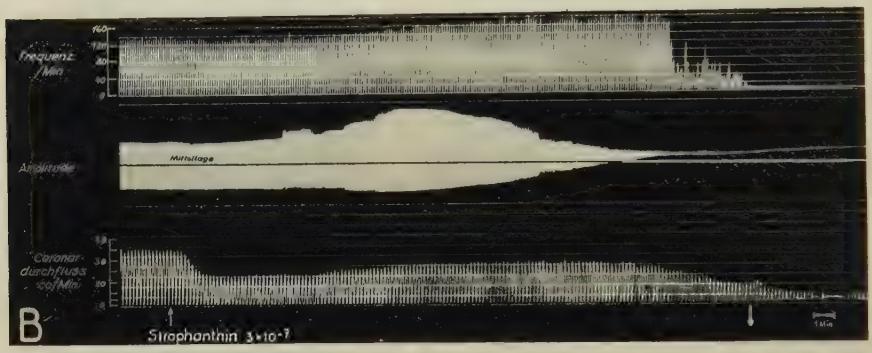


Abb. 3 *B.* Irreversible Wirkung von g-Strophanthin.

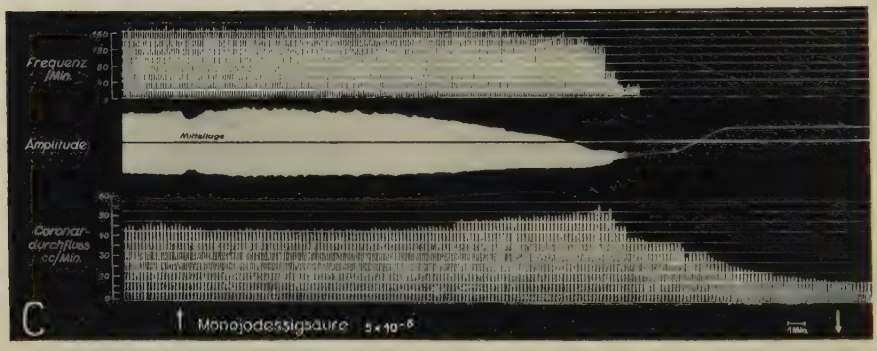


Abb. 3 *C.* Monojodessigsäure.

gesprochen spezifisch für das Myocardium, während die glatte Muskulatur verschiedener anderer Testorgane unter den üblichen Versuchsbedingungen nicht betroffen wird.

2. Herzwirkungen am Ganztier.

Nach Letaldosen von Nr. 11072 wird in den meisten Fällen sowohl bei Kalt- als auch bei Warmblütern ein systolischer Stillstand des Herzens in situ beobachtet, welcher nach parenteraler und peroraler Verabreichung an verschiedenen Tierarten (Katze, Kaninchen, Maus, Ratte und Frosch) auftritt. Dies läßt sich speziell am *Frosch* gut registrieren, wobei mit Hilfe der entsprechenden Dosis/Wirkungskurven Nr. 11072 etwa 100mal weniger wirksam ist als g-Strophanthin.

An der mit Dial narkotisierten Katze zeigte Nr. 11072 im HATCHER-Test[14] nur 0,03 Katzen-Einheiten/mg; seine Wirksamkeit ist somit etwa 300mal geringer als diejenige von g-Strophanthin und daher als unspezifisch zu betrachten.

Ferner wurde am Ganztier (Kaninchen) fortlaufend das *Schlag- und Minutenvolumen* photoelektrisch registriert[22, 23, 32, 33]. Dabei bewirkte Nr. 11072 in Dosen von 0,5—1,0 mg/kg intravenös nur eine geringe und kurzdauernde Zunahme der Herztätigkeit. An der Katze wurde eine deutliche *Bradykardie* beobachtet, welche mindestens zum Teil vagal bedingt ist, da sie durch Atropin gehemmt wird. Tatsächlich erzeugt Nr. 11072 sowohl bei parenteraler als auch bei peroraler Verabreichung charakteristische Veränderungen im Reizleitungssystem. An der Katze z. B. treten diese EKG-Änderungen nach 2—20 mg/kg intravenös relativ spät auf; sie sind meist reversibel und zeigen eine gewisse Ähnlichkeit mit denjenigen, die nach Herzglykosiden zu beobachten sind[1, 35], wie Verlängerung des PQ-Abstandes, Änderungen der R-Zacke, Abflachung und Inversion der bei der Katze normalerweise positiven T-Zacke, Arrhythmien mit Sinus- oder Kammerextrasystolen (Abb. 4).

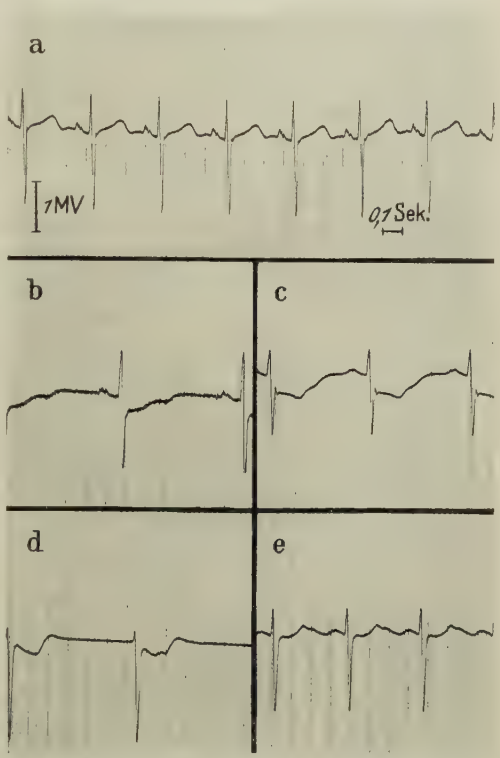


Abb. 4. EKG an der Katze (Narkose mit Dial, 0,06 g/kg i.p.). *a* Kontrolle; *b* 2 min nach Nr. 11072 0,015 g/kg i.v.; *c* 5 min nach der Injektion; *d* 7 min nach der Injektion; *e* 10 min nach der Injektion.

Weitere Kreislauf- bzw. Herzwirkungen wurden nicht beobachtet. Insbesondere ließen sich am Hund und an der Katze mit der REINschen Thermostromuhr keine nennenswerten Durchflußänderungen der Coronargefäße nach 0,1—3,0 mg/kg intravenös nachweisen, und der Druck im rechten Vorhof wurde ebenfalls nicht beeinflußt[12].

Es sei noch erwähnt, daß an verschiedenen Tierarten (Taube, Katze und Hund) in kurzfristigen Versuchen keine Brech- und keine diuretische

Wirkung bis zu 5 mg/kg intravenös festgestellt werden konnte. Das Fehlen von zentraler Erregung und diuretischer Wirkung nach Nr. 11072 steht somit im Gegensatz zu den bekannten Eigenschaften der Herzglykoside.

Wenn wir unsere Befunde über die Herzwirkung von Nr. 11072 kurz zusammenfassen, so ergibt sich, daß dieses Chinoxalinderivat am Herzmuskel eine ausgesprochene tonisierende Wirkung mit systolischer Einstellung erzeugt. Diese Kontraktur tritt bei Kalt- und Warmblütern sowohl am isolierten Herzen als auch am Ganztier auf und geht mit verschiedenen EKG-Änderungen einher. Im Gegensatz zu der Wirkung der Herzglykoside ist sie jedoch meistens reversibel, ihr Typus zeigt deutliche Unterschiede zu demjenigen von g-Strophanthin und Cristafolin. Diese tonisierende Wirkung bzw. Erregung der Herzmuskulatur ist aber an anderen Organen wie Gefäßen, Darm, Uterus und Samenblase nicht nachweisbar. Schließlich fehlen am Ganztier die zentralbedingte Brechwirkung wie auch die diuretische Wirkung, welche für Herzglykoside charakteristisch sind.

Nr. 11072 zeigt somit eine eigenartige Herzwirkung, welche nur teilweise den bekannten Eigenschaften der Herzglykoside entspricht. Da aber die letztgenannten Stoffe lediglich einen begrenzten pharmakologischen Aspekt der Herzwirksamkeit darstellen, welcher wohl aber der therapeutisch interessante ist, haben wir die Wirkung von Nr. 11072 mit verschiedenen anderen Methoden weitergeprüft, welche für Strophanthin- und Digitaliskörper seit längerer Zeit verwendet werden. Außerdem haben wir als weiteres Herzgift eine thiolopriv wirkende Substanz zum Vergleich herangezogen, da solche Stoffe ebenfalls einen gar nicht uninteressanten Einfluß auf den Herzmuskel auszuüben vermögen. Nach verschiedenen Autoren, besonders nach Bacq und Mitarbeitern[2, 3, 6], erzeugen eine Serie von Substanzen wie Schwermetallionen, As-Derivate, Yperit, Superoxyde usw. eine Wirkung auf die quergestreifte Muskulatur, welche durch spezifische Störungen gewisser enzymatischer Funktionen und Hemmungen verschiedener energetischer Stoffwechselmechanismen gekennzeichnet ist. Da diese Reaktionen vorwiegend mit den SH-Gruppen von Cystin, Cystein und Zellproteinen zustandekommen, wurden solche Stoffe „*thiolopriv*" genannt. Viele davon, besonders die Monohalogenessigsäuren, erzeugen unter gewissen Versuchsbedingungen eine charakteristische Muskelkontraktur, welche nach Bacq und Mitarbeitern eine gewisse Ähnlichkeit mit der tonisierenden systolischen Wirkung der Herzglykoside aufweisen soll und ebenfalls mit der besonderen Herzwirkung der Angelikalaktone[17, 26] und anderer Pharmaka aus den verschiedensten pharmakologischen bzw. chemischen Gruppen wie z. B. Laktone, Ascorbinsäure, H_2O_2, Veratridin, Erythrophlein usw.[16, 18, 20, 26, 31, 37] in einem gewissen Zusammenhang zu stehen scheint.

Ohne näher auf die relativ große Anzahl manchmal sich widersprechender Arbeiten über den Wirkungsmechanismus aller dieser herzwirksamen Pharmaka einzugehen, schien es uns interessant, Nr. 11072 mit thiolopriven Pharmaka zu vergleichen. Unsere Prüfungen beziehen sich dabei auf g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure als Vertreter der thiolopriven Pharmaka. Der letztgenannte Stoff erzeugt unter normalen Versuchsbedingungen keine ausgesprochene systolische Tonisierung des isolierten Froschherzens, sondern eher einen Stillstand in Mittelstellung[25]. Am isolierten Warmblüterherzen dagegen erzeugt er schon in niederen

Konzentrationen einen deutlichen systolischen Stillstand, wie aus Abb. 3 ersichtlich ist. Bei den folgenden Weiterprüfungen haben wir somit Gelegenheit gehabt, einige pharmakologische Eigenschaften der Monojodessigsäure näher zu untersuchen, wobei selbstverständlich die entsprechenden Vergleiche bzw. Schlußfolgerungen nicht auf alle thiolopriven Pharmaka auszudehnen sind.

3. Wirkung auf die Atmung des Herzmuskels.

Die charakteristische Wirkung der Herzglykoside auf die Atmung der Herzmuskulatur ist von vielen Versuchsbedingungen abhängig, so daß eine Zusammenfassung der in der Literatur angegebenen Resultate eher schwierig ist (siehe Literatur bei [19, 36, 37]). Immerhin scheint es relativ klar zu sein, daß Schnitte von Meerschweinchenherzen eine deutliche Zunahme des O_2-Verbrauches nach niederen Konzentrationen von z. B. g-Strophanthin zeigen, während nach höheren Konzentrationen eine starke Abnahme eintritt.

Wir haben die Atemwirkung verschiedener Konzentrationen von Nr. 11072, g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure auf Gewebsschnitte von Meerschweinchenherzen nach Warburg in Krebs-Ringer-Phosphat-Glucose (0,2%)-Lösung geprüft. Die so erhaltenen Daten sind in Abb. 5 graphisch wiedergegeben.

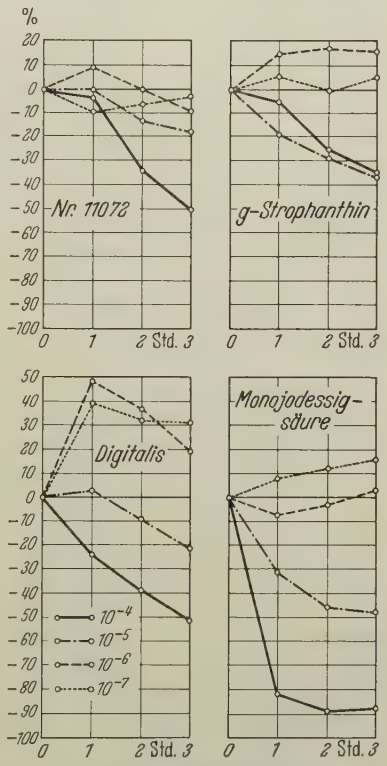


Abb. 5. Atemwirkung auf Herzschnitte (Meerschweinchen). Ordinate: Prozentuale Änderungen des Q/O_2. Abszisse: Zeit in Stunden.

Der zeitliche Verlauf der Atemkurven zeigt, daß g-Strophanthin und besonders Cristafolin bei Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-6} meist eine deutliche Zunahme des O_2-Verbrauches erzeugen, während bei höheren Konzentrationen regelmäßig eine mittlere bis starke Abnahme auftritt. Nr. 11072 dagegen bewirkt nur eine kurzdauernde, noch im Fehlerbereich liegende Zunahme des O_2-Verbrauches bei 10^{-6}, wohl aber eine deutliche Abnahme bei 10^{-5} und 10^{-4} wie die geprüften Herzglykoside. Die Atemwirkung von Monojodessigsäure ist in den Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-4} vorwiegend negativ. Dabei ist sie deutlich wirksamer als die drei Vergleichssubstanzen.

Wenn somit die hier geprüften Herzgifte zum Oxydationsstoffwechsel der Herzmuskulatur wohl in engerer Beziehung stehen mögen, so sind

doch in dieser Hinsicht klare Unterschiede feststellbar. Weder Nr. 11072 noch besonders Monojodessigsäure sind imstande, den O_2-Verbrauch des Herzens in deutlicher Weise zu erhöhen, wie es für g-Strophanthin und besonders Cristafolin der Fall ist.

Es ist schon aus der Literatur bekannt, daß die Atemwirkung herzwirksamer Stoffe und besonders die Zunahme des O_2-Verbrauches in einem bestimmten, relativ engem Konzentrationsbereich und scheinbar nur in einer bestimmten Zeit nach Zugabe, stark von einer bestimmten chemischen Struktur abhängig ist, welche gleichzeitig für die charakteristische Herzwirkung bzw. für die digitalisähnliche systolische Tonisierung verantwortlich zu sein scheint[37]. Dabei zeigen z. B. verschiedene Herzgifte wie Laktone usw. keine Zunahme des O_2-Verbrauches. Gemäß den obigen Atemversuchen würden Nr. 11072 und Monojodessigsäure zum gleichen Typus gehören, der vorwiegend hemmt, wobei jedoch zu bemerken wäre, daß der thioloprive Stoff deutlich wirksamer ist.

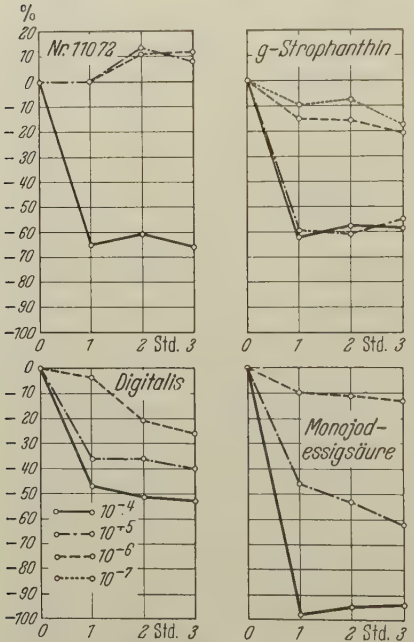


Abb. 6. Beeinflussung der Glykolyse an Herzschnitten (Meerschweinchen). Ordinate: Prozentuale Änderungen des Q/CO_2. Abszisse: Zeit in Stunden.

4. Anaerobe Glykolyse.

Nicht nur die Herzglykoside[19, 36, 37], sondern auch die thiolopriv wirkenden Stoffe[2, 3, 6] üben eine deutliche Wirkung auf den anaeroben Kohlenhydratstoffwechsel aus, welche im allgemeinen durch Hemmung der anaeroben Glykolyse gekennzeichnet ist. An Schnitten von Meerschweinchenherzen haben wir mit der Barcroft-Warburgschen Methode in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Glucose(0,2%)-Lösung unter Stickstoff verschiedene Konzentrationen von Präparat Nr. 11072, g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure untersucht. Unsere experimentellen Ergebnisse sind in Abb. 6 kurvenmäßig wiedergegeben.

Nr. 11072 ruft in den Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} eine die Fehlerbreite der Methode nicht überschreitende Förderung der anaeroben Glykolyse hervor, bei 10^{-4} dagegen eine starke Hemmung. Bei den drei Vergleichspräparaten kommt im geprüften Dosenbereich von 10^{-7} bis 10^{-6} bis 10^{-4} nur eine deutliche bis starke Hemmung der Glykolyse zum Ausdruck, wobei Monojodessigsäure am wirksamsten ist.

Die Literaturangaben über die Wirkung verschiedener Herzglykoside auf die für die Glykolyse verantwortlichen Fermentsysteme sind stark widersprechend, da

diese Wirkung in einem hohen Maße von den gewählten Versuchsbedingungen und besonders vom untersuchten Konzentrationsbereich abhängig ist[37]. Sowohl Digitalis-Glykoside als auch Digitaloide zeigen in dieser Hinsicht qualitative Unterschiede gegenüber g-Strophanthin, so daß die chemische Struktur, welche für einen digitalisähnlichen Effekt am Herzen mitverantwortlich ist, nicht ohne weiteres den Kohlehydratstoffwechsel des Herzmuskels in ähnlichem Sinne zu beeinflussen vermag. Dies ist noch mehr für thioloprive Stoffe der Fall, welche im allgemeinen die Glykolyse verschiedener Gewebe wie Gehirn, Haut, Knochen, Milz, Thymus usw.[2] in starkem, aber eher unspezifischem Maße hemmen, so daß die in Abb. 6 wiedergegebene qualitativ ähnliche Beeinflussung der anaeroben Glykolyse der Herzmuskulatur kein entscheidendes Argument für den Vergleich der Wirkungsmechanismen von Nr. 11072, g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure darzustellen scheint.

5. Beeinflussung der Herzwirkung durch Ca-Mangel an Kaltblütern.

Daß die Wirkung von Digitalis und g-Strophanthin am isolierten Froschherzen stark vom Ca-Gehalt der RINGER-Lösung abhängig ist, ist wohl eine seit längerer Zeit bekannte Tatsache[19, 37]. LOEWI, einer der ersten, die den Einfluß des Ca und des Ca/K-Verhältnisses ausführlich untersuchten[21], fand unter anderem, daß sonst wirksame Strophanthinkonzentrationen am mit Ca-freier RINGER-Lösung durchströmten isolierten Froschherzen keine systolische Tonisierung mehr erzeugen. Nach Ca-Zusatz tritt aber die typische systolische Wirkung wieder auf. Deshalb untersuchten wir am isolierten Froschherzen die Wirkung von Nr. 11072 und von den drei Vergleichspräparaten unter Ca-Mangel, wobei unsere normale Frosch-RINGER-Lösung 0,03% Ca enthielt. Ein Beispiel der so erhaltenen Resultate ist in Abb. 7 kurvenmäßig wiedergegeben.

Die unterste Kurve zeigt, daß die Ca-freie Nährflüssigkeit eine Abnahme der Herztätigkeit mit diastolischer Einstellung verursacht, welche durch Zugabe von steigenden Ca-Konzentrationen aufgehoben wird. Unter den gleichen Versuchsbedingungen sind Nr. 11072, g-Strophanthin und Monojodessigsäure ohne Ca-Zusatz unwirksam. Die für jeden Stoff charakteristische, aber doch qualitativ etwas andere systolische Kontraktur erscheint unter dem Einfluß von $CaCl_2$ 3×10^{-5} bis 10^{-3} in praktisch gleichem Maße wieder. Cristafolin dagegen bewirkt bei dieser Versuchsanordnung schon in Ca-freier RINGER-Lösung eine Zunahme der Amplitude, welche nur in Anwesenheit von Ca-Ionen zu systolischer Einstellung wird.

Solche qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Herzglykosiden und bei gewissen Versuchsbedingungen sogar widersprechende Resultate sind bereits bekannt[11, 15], und es wurde auch beobachtet, daß Angelikalaktone und Ascorbinsäure die Wirkung des Ca-Mangels antagonistisch beeinflussen[16, 17]. Die von LOEWI aufgestellte Theorie der „Digitaliswirkung als Sensibilisierung für Ca-Ionen" schien somit für gewisse Herzglykoside nicht ganz gültig zu sein. Auf Grund der hier mitgeteilten Versuche könnte angenommen werden, daß die Anwesenheit von Ca-Ionen nicht nur für die systolische Wirkung von g-Strophanthin und Digitalis-

Glykosiden, sondern auch für diejenige anderer Herzgifte wie Nr. 11072 und Monojodessigsäure Vorbedingung ist. Ca-Ionen scheinen somit eine, allerdings für Herzglykoside keineswegs spezifische, Sensibilisierung der Muskulatur des Froschherzens hervorzurufen, welche aber nur in einer allgemeinen Kontrakturbereitschaft der Herzmuskulatur besteht und eventuell mit Permeabilitätsänderungen der Muskelzelle zusammenhängt.

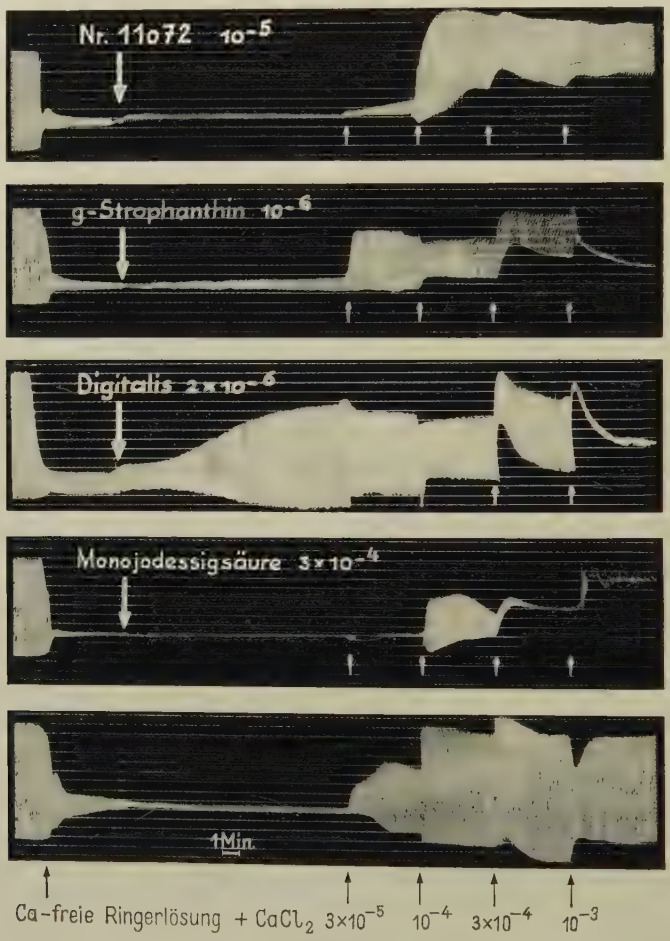


Abb. 7. Einfluß von Ca^{++} auf die Herzwirkung von Nr. 11072, g-Strophanthin, Digitalis (Cristafolin) und Monojodessigsäure am isolierten Froschherzen.

6. Beeinflussung der Herzwirkung durch Hypodynamie an Kaltblütern.

Da die früher unter Abschnitt 3 besprochenen Resultate eine unterschiedliche Wirkung von g-Strophanthin und Digitalis einerseits und von Nr. 11072 und Monojodessigsäure andererseits auf die Atmung der Herzmuskulatur zeigten, haben wir die Wirkung unserer Substanzen

am hypodynamischen Froschherzen weiter untersucht. Dabei wurde die Hypodynamie durch langdauernde Durchströmung ohne O_2 und ohne Wechseln der RINGER-Lösung erzeugt. Unter diesen Bedingungen bewirken sowohl Nr. 11072 als auch g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure eine deutliche Zunahme der Amplitude. Außerdem rufen die drei erstgenannten Herzgifte einen ausgesprochenen systolischen

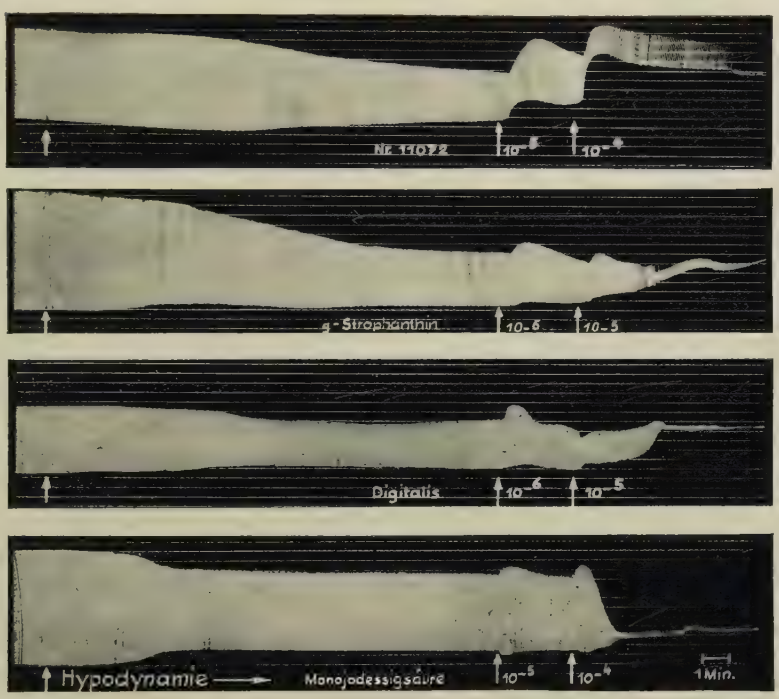


Abb. 8. Wirkung von Nr. 11072, g-Strophanthin, Digitalis (Cristafolin) und Monojodessigsäure am isolierten hypodynamischen Froschherzen.

Stillstand hervor, während Monojodessigsäure nur einen diastolischen Stillstand erzeugt (Abb. 8).

Wie schon erwähnt, ist die Herzwirkung von Monojodessigsäure am mit O_2 durchströmten isolierten Froschherzen nicht eindeutig systolisch. Interessant ist jetzt die Beobachtung, daß auch unter O_2-Mangel sowohl die Herzglykoside als auch Nr. 11072 ihren ausgesprochen systolischen Wirkungscharakter beibehalten und sich darin von dem thiolopriv wirkenden Stoff unterscheiden. Dies spricht wiederum für eine unterschiedliche Wirksamkeit der untersuchten Pharmaka auf den energetischen Stoffwechselmechanismus der Herzmuskulatur, wobei Nr. 11072 näher bei den Herzglykosiden als beim thiolopriven Stoff zu liegen scheint.

7. Beeinflussung der Herzwirkung durch Anoxämie an Warmblütern.

In einer früheren Arbeit[24] haben wir berichtet, daß die typischen Wirkungen von g-Strophanthin am isolierten Warmblüterherzen deutlich vom O_2- bzw. CO_2-Gehalt der Durchströmungsflüssigkeit abhängig sind. Die durch Anoxämie erzeugte Coronarerweiterung wird z. B. durch niedere Konzentrationen von g-Strophanthin in eine Verengerung umgewandelt, während je nach dem CO_2-Gehalt der Gaszufuhr sowohl die chronotrope und inotrope Wirkung als auch die systolische Einstellung durch g-Strophanthin unterschiedlich beeinflußbar sind[24]. Nun haben wir die Wirkung von Nr. 11072 wie früher an nach der Langendorffschen Methode durchströmten Kaninchenherzen untersucht und die dabei erhaltenen Mittelwerte in Abb. 9 graphisch dargestellt.

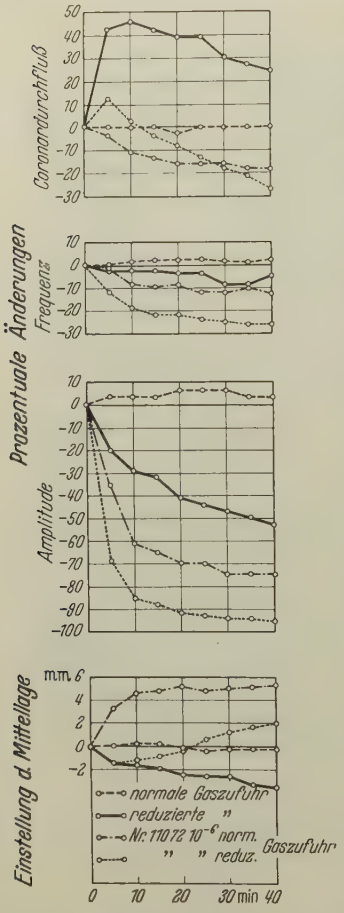


Abb. 9. Wirkung von Nr. 11072 10^{-6} am isolierten Kaninchenherzen nach Langendorff bei normaler und reduzierter Gaszufuhr.

Die Reduktion des $O_2 + 5\%$ CO_2-Gehaltes der Durchströmungsflüssigkeit auf etwa 5% erzeugt die bekannte starke Erweiterung der Coronargefäße mit geringerer Bradykardie, starker Abnahme der Hubhöhe und deutlicher diastolischer Einstellung. Unter diesen anoxämischen Bedingungen ruft nun Nr. 11072 vorwiegend eine Hemmung der Coronarerweiterung hervor und zeigt eine deutliche Verstärkung seiner negativ chronotropen und inotropen Wirkungen. Die für die Herzwirkung von Nr. 11072 charakteristische systolische Einstellung wird also durch diese anoxämischen Bedingungen deutlich gehemmt.

Vergleichen wir diese Befunde mit jenen, welche für g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure unter ähnlichen Versuchsbedingungen erhalten wurden, so ergeben sich nach 40 min Einwirkungszeit unterschiedliche mittlere Veränderungen, die in Abb. 10 graphisch dargestellt sind.

Die Analyse der in Abb. 10 wiedergegebenen Daten zeigt, daß im untersuchten Konzentrationsbereich, wo jedes Herzgift deutliche Wirkungen ausübt, insbesonders eine eindeutige systolische Tonisierung, sowohl Präparat Nr. 11072 als auch g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure eine Verengerung der Coronargefäße hervorrufen.

Unter anoxämischen Bedingungen wirken aber Cristafolin und besonders Monojodessigsäure auf die Coronargefäße verengernd. Diese Wirkungen können jedoch auch durch Dehnungsänderungen der Herzmuskulatur mechanisch bedingt sein. Ferner wird die positiv chronotrope Wirkung von g-Strophanthin und Cristafolin unter anoxämischen Bedingungen erheblich verstärkt, während die durch Nr. 11072 und Monojod-

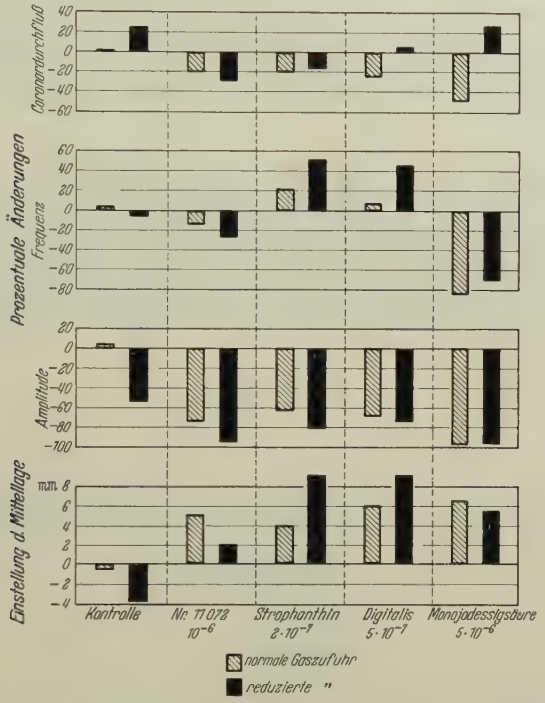
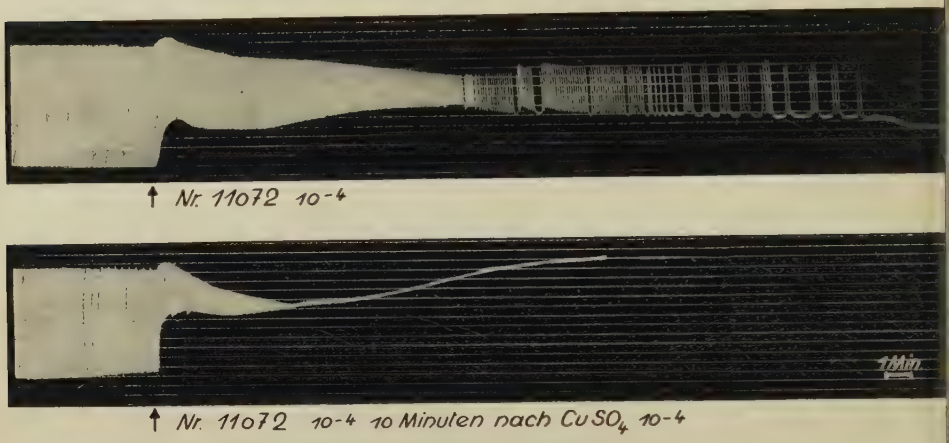


Abb. 10. Beeinflussung der Herzwirkung von Nr. 11072, g-Strophanthin, Digitalis (Cristafolin) und Monojodessigsäure durch Reduktion der Gaszufuhr am isolierten Kaninchenherzen nach LANGENDORFF.

essigsäure erzeugte Bradykardie im ersteren Fall etwas verstärkt, im letzteren etwas gehemmt wird. Solche Änderungen sprechen für eine unterschiedliche Beeinflussung des Reizleitungssystems des Herzens, worauf auch die Beobachtungen am Ganztier und besonders die EKG-Änderungen nach Nr. 11072 (Abb. 4) schließen lassen. Während die Reduktion der Gaszufuhr die negativ inotrope Wirkung der vier untersuchten Stoffe praktisch gleichsinnig beeinflußt, ist ihr Effekt auf die systolische Einstellung besonders interessant. Tatsächlich wird nur die durch g-Strophanthin und Cristafolin erzeugte Tonisierung verstärkt, während diejenige von Monojodessigsäure schwach, diejenige von

Nr. 11072 dagegen stark gehemmt wird. Es findet sich somit am Warmblüterherzen ein Wirkungsunterschied zwischen Nr. 11072 und dem thiolopriven Stoff einerseits sowie Herzglykosiden andererseits, welcher am hypodynamischen Froschherzen nicht zu beobachten war.



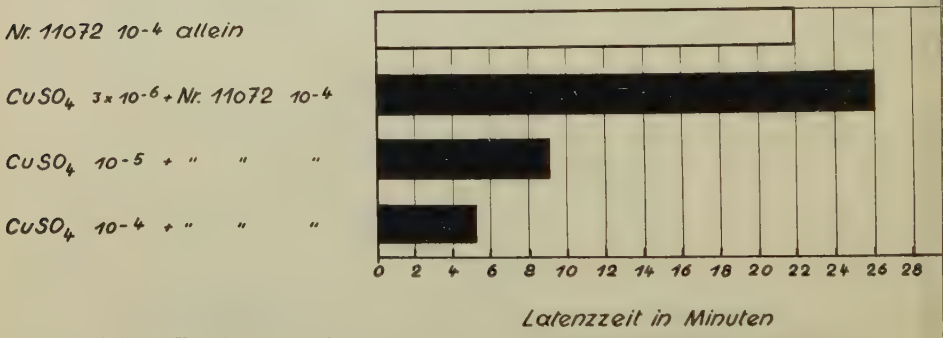


Abb. 11. Verstärkung der Herzwirkung von Nr. 11072 durch Vorbehandlung des isolierten Froschherzens mit $CuSO_4$ $10^{-5}-10^{-4}$.

8. Beeinflussung der Herzwirkung durch Cu^{++}.

Nach relativ neuen Beobachtungen von Chenoweth u. Mitarb. wird die Toxizität von Herzglykosiden durch Cu^{++} je nach Tierart bzw. herzwirksamen Glykosiden herabgesetzt bzw. verstärkt[4, 5, 7, 13]. Im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen haben wir zum Teil ähnliche Befunde erhalten, und in Bestätigung der Beobachtungen früherer Autoren[10, 29] haben wir kürzlich berichtet[25], daß die spezifische Herzwirkung von g-Strophanthin und Cristafolin, insbesonders die Tonisierung mit systolischem Stillstand des *isolierten Froschherzens*, durch Vorbehandlung mit $CuSO_4$ deutlich verstärkt wird.

Für Monojodessigsäure haben wir vor allem beobachtet, daß $CuSO_4$ den systolischen Charakter der Kontraktur erheblich begünstigt[25]. Nun haben wir ähnliche Prüfungen mit Präparat Nr. 11072 durchgeführt und gefunden, daß die tonisierende Wirkung des Chinoxalinderivates wohl durch $CuSO_4$ 3×10^{-6} etwas gehemmt, durch höhere $CuSO_4$-Konzentrationen dagegen verstärkt wird (Abb. 11).

Betrachten wir, wie früher, die Latenzzeit bis zum systolischen Stillstand als ungefähres Maß der Wirksamkeit der Herzgifte, so ergeben sich für Nr. 11072, g-Strophanthin, Cristafolin und Monojodessigsäure Werte, die zum Vergleich in Abb. 12 graphisch dargestellt sind. Dabei werden alle vier geprüften Herzgifte durch an sich unwirksame Konzentrationen von $CuSO_4$ in erheblichem Maße verstärkt.

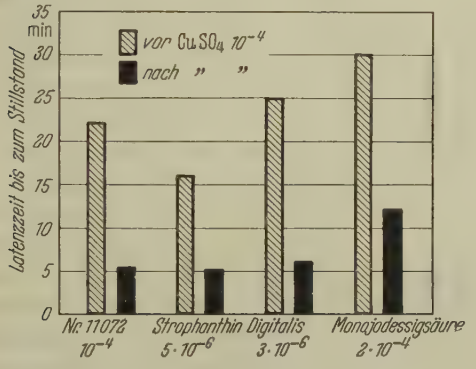


Abb. 12.

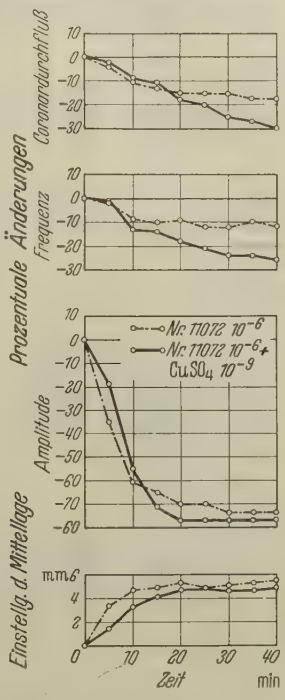


Abb. 13.

Abb. 12. Verstärkung der Herzwirkung von Nr. 11072, g-Strophanthin, Digitalis (Cristafolin) und Monojodessigsäure durch $CuSO_4$ am isolierten Froschherzen.

Abb. 13. Einfluß von $CuSO_4$ auf die Herzwirkung von Nr. 11072 am isolierten Kaninchenherzen (Durchströmung nach LANGENDORFF).

Quantitative, aber nicht qualitative Unterschiede sind wohl vorhanden, woraus hervorgeht, daß die Vorbehandlung mit Cu^{++} eine ausgesprochene Sensibilisierung der Herzmuskulatur hervorzurufen vermag.

Kürzlich haben wir berichtet[25], daß auch am *Warmblüterherzen* (Durchströmung des isolierten Kaninchenherzens nach der Methode von LANGENDORFF) niedere Konzentrationen von $CuSO_4$ sowohl auf Coronargefäße, chronotrope und inotrope Wirkung, als auch auf die systolische Einstellung einwirken. Dabei wurde besonders beobachtet, daß nur der systolische Charakter der durch g-Strophanthin erzeugten Kontraktur verstärkt wird[25]. Unter gleichen Versuchsbedingungen zeigt sich nun, daß die Wirkung von Nr. 11072 auf die Coronargefäße und auf

die Herzfrequenz etwas verstärkt wird, während die negativ inotrope Wirkung und insbesondere die systolische Einstellung der Mittellage unbeeinflußt bleiben (Abb. 13).

Verglichen mit den anderen von uns untersuchten Herzgiften, weist Nr. 11072 somit gewisse Unterschiede auf, welche z. B. nach 40 min Einwirkungszeit in Abb. 14 graphisch wiedergegeben sind.

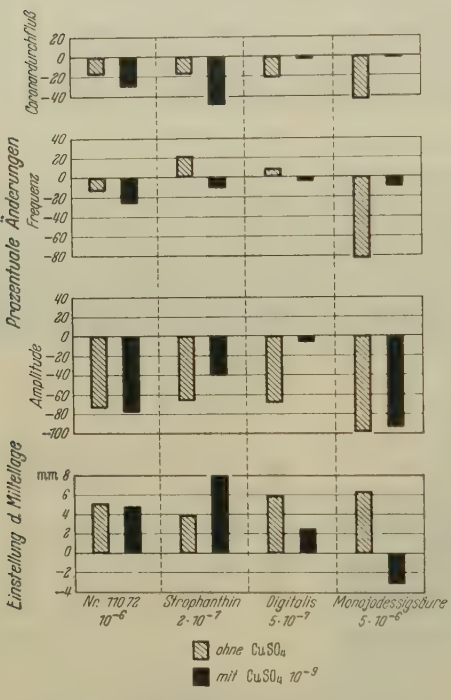


Abb. 14. Beeinflussung der Herzwirkung von Nr. 11072, g-Strophanthin, Digitalis (Cristafolin) und Monojodessigsäure durch $CuSO_4$ (isoliertes Kaninchenherz nach Langendorff).

Aus der Abbildung geht zunächst hervor, daß nur die durch Nr. 11072 und g-Strophanthin erzeugte Erweiterung der Coronargefäße durch gleichzeitige Behandlung mit $CuSO_4$ 10^{-9} verstärkt, diejenige von Cristafolin und Monojodessigsäure dagegen stark gehemmt wird. Da aber diese Gefäßwirkungen wie im früheren Falle der Einwirkung der reduzierten Gaszufuhr möglicherweise sekundär, zum Teil durch mechanische Zustandsänderungen der Herzmuskulatur bedingt sind, werden sie für den Vergleich der Wirkungsmechanismen der untersuchten Herzgifte nicht weiter berücksichtigt. Die positiv chronotrope Wirkung von g-Strophanthin und Cristafolin wird nicht nur gehemmt, sondern sogar in eine negative umgewandelt. Die Bradykardie nach dem thiolopriven Stoff wird stark gehemmt, während diejenige nach Nr. 11072 eher verstärkt wird. Dies spricht für sehr unterschiedliche Wirkungen auf das Reizleitungssystem des Herzens. Für die Beeinflussung der Inotropie liegen die Verhältnisse einfacher, indem die zwei geprüften Herzglykoside und besonders Cristafolin nach $CuSO_4$ weniger wirksam sind. Nr. 11072 und der thiolopriv Stoff dagegen praktisch unbeeinflußt bleiben. Hinsichtlich der Einstellung der Mittellage, welche stark systolisch ist, finden wir eine uneinheitliche Beeinflussung durch $CuSO_4$, indem die Wirkung von Nr. 11072 nicht beeinträchtigt, g-Strophanthin verstärkt, Cristafolin gehemmt wird und Monojodessigsäure eine diastolische Einstellung zeigt.

9. Beeinflussung der Herzwirkung durch Cystein.

Mendez und Mitarbeiter haben gezeigt, daß S-haltige Stoffe wie Cystein und Glutathion am isolierten Froschherzen die tonisierende Wirkung von gewissen Herzgiften wie Angelikalaktonen, Peroxyden und Stoffen, welche mit SH-Gruppen reagieren, zu hemmen vermögen, wenn sie als Lösungsvermittler für die Herzgifte dienen[26, 27]. Kürzlich wurden wieder ähnliche Beobachtungen über einen Antagonismus zwischen Schwermetallen und Cystein auf die systolische Kontraktur des isolierten Froschherzens publiziert[8].

Wir haben nun diese Einwirkung von Cystein auf unsere vier Herzgifte ebenfalls untersucht, wobei in Abweichung von der Versuchsmethode von Mendez und Mitarbeitern[26, 27] die isolierten Froschherzen etwa 5 min durch Cystein 10^{-4} prophylaktisch vorbehandelt wurden und die Latenzzeit bis zum systolischen Stillstand bzw. bis zur 90%igen systolischen Abnahme der Amplitude wie üblich als Maß der Herzwirksamkeit bestimmt wurde. Die so erhaltenen Mittelwerte sind in Abb. 15 graphisch wiedergegeben.

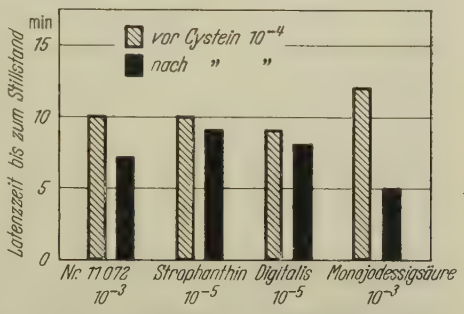


Abb. 15. Beeinflussung der Herzwirkung von Nr. 11072, g-Strophanthin, Digitalis (Cristafolin) und Monojodessigsäure durch Cystein am isolierten Froschherzen.

Wie aus Abb. 15 hervorgeht, wird nur die Herzwirkung von Monojodessigsäure durch Cystein 10^{-4} stark verstärkt, im Gegensatz zu den Beobachtungen von Mendez[26, 27], welche übrigens mit anderen in S-haltigen Stoffen gelösten Herzgiften gemacht wurden. Die Wirkung von Nr. 11072 ist wohl gleichsinnig beeinflußt, aber deutlich schwächer, diejenige von g-Strophanthin und Cristafolin ist nur schwach verstärkt. Entsprechende Versuche über die Wirkung von Cystein 10^{-4} auf verschiedene Konzentrationen der vier untersuchten Herzgifte ($5 \cdot 10^{-6}$—10^{-3}) haben ein ähnliches Verhalten ergeben: bei keiner Konzentration wurde die systolische Wirkung von g-Strophanthin bzw. Cristafolin durch Cystein deutlich beeinflußt, während diejenige von Nr. 11072 und Monojodessigsäure immer verstärkt wurde. Dieser grundsätzliche Unterschied zwischen unseren Befunden und denjenigen von Mendez (a. a. O.) ist wahrscheinlich auf eine „in vitro" Neutralisierung der SH-antagonistisch wirkenden Gifte zurückzuführen, während in unseren Versuchen die Reaktion zwischen einer an sich praktisch herzunwirksamen Cysteinkonzentration und den untersuchten Herzgiften am isolierten Herzen vor sich geht. Jedenfalls zeigt sich hier ein deutlicher Unterschied zwischen g-Strophanthin und Cristafolin einerseits und Nr. 11072 und Monojodessigsäure anderseits, indem nur die letztgenannten Stoffe, besonders das thioloprive Pharmakon, durch Cystein verstärkt werden.

Diskussion.

Die berichteten Beobachtungen geben zunächst kein eindeutiges Bild über die Stellung von Nr. 11072 als herzwirksame Substanz im Vergleich zu g-Strophanthin und Cristafolin, bzw. zu Monojodessigsäure. Fassen wir unsere Befunde tabellarisch zusammen, so ergeben sich folgende Vergleiche, welche für die pharmakologische Beurteilung der spezifischen Wirkung der Herzglykoside und besonders ihres therapeutischen Effektes am insuffizienten Herzen doch nicht ohne Interesse sind, wobei zu

Tabelle 1.

Wirkungen am isolierten Herzen	Nr. 11072	g-Strophanthin	Digitalis (Cristafolin)	Monojod-essigsäure
1. Warmblüter				
Reversibilität der Kontraktur	+	—	—	—
Wirkung auf die Coronargefäße				
normal	Verengerung	Verengerung	Verengerung	Verengerung
in Anoxämie	verstärkt	(gehemmt)	umgekehrt	umgekehrt
nach Cu^{++}	verstärkt	verstärkt	gehemmt	gehemmt
Chronotrope Wirkung				
normal	Bradykardie	Tachykardie	Tachykardie	Bradykardie
in Anoxämie	verstärkt	verstärkt	verstärkt	gehemmt
nach Cu^{++}	verstärkt	umgekehrt	umgekehrt	gehemmt
Inotrope Wirkung				
normal	negativ	negativ	negativ	negativ
in Anoxämie	verstärkt	verstärkt	(verstärkt)	unbeeinflußt
nach Cu^{++}	(verstärkt)	gehemmt	gehemmt	(gehemmt)
Mittellage der Kontraktur				
normal	systolisch	systolisch	systolisch	systolisch
in Anoxämie	gehemmt	verstärkt	verstärkt	gehemmt
nach Cu^{++}	(gehemmt)	verstärkt	gehemmt	umgekehrt
Verstärkung der Atmung in niederen Konz.	(+)	+	+	(+)
Hemmung der Atmung in höheren Konz.	+	+	+	+
Hemmung der anaeroben Glykolyse	+	+	+	+
2. Frosch				
Systolische Kontraktur	+	+	+	(+)
Reversibilität der Kontraktur	+	—	—	—
Unwirksamkeit bei Ca-Mangel	+	+	(+)	+
Wirkung bei Hypodynamie	systolisch	systolisch	systolisch	diastolisch
Wirkung nach Cu^{++}	verstärkt	verstärkt	verstärkt	verstärkt
Wirkung nach Cystein	verstärkt	0	0	verstärkt

betonen ist, daß bis jetzt nur die Digitalis- bzw. die Strophanthinkörper diesen Gesamteffekt besitzen:

Die Analyse der obigen Tabelle ergibt zunächst, daß g-Strophanthin und Cristafolin meistens ähnliche Teilreaktionen bei den verschiedenen Testobjekten (Warm- oder Kaltblüterherz, Atmungsversuche, Glykolyse), nach Beeinflussung der Herzwirkung durch diverse Pharmaka (Ca^{++}, Cu^{++}, Cystein), oder bei Hypodynamie und Anoxämie aufweisen.

Nr. 11072 reagiert in qualitativer Beziehung an verschiedenen Testobjekten ähnlich wie die untersuchten Herzglykoside; quantitativ sind aber oft höhere Konzentrationen des Chinoxalinderivates nötig, um diese Effekte hervorzurufen. Außerdem zeigt Nr. 11072 ganz andere Teilreaktionen als die Herzglykoside, z. B. hinsichtlich der Anoxämie am Warmblüterherzen, der Förderung der Muskelatmung, der Beeinflussung durch Cystein am Kaltblüterherzen oder durch Cu^{++} am Warmblüterherzen. Da aber ein deutlicher Unterschied zwischen g-Strophanthin und Cristafolin z. B. am Warmblüterherzen ebenfalls hinsichtlich der systolischen Einstellung nach Zugabe von Cu^{++} vorhanden ist, genügt dies nicht zur Charakterisierung der spezifischen therapeutischen Wirkung eines Herzglykosides.

Monojodessigsäure zeigt ebenfalls an einigen Testobjekten ähnliche Teilwirkungen wie g-Strophanthin und Cristafolin. Bei der Mehrzahl der Reaktionen wirkt es aber anders, und außerdem weicht sein Verhalten in jenen Fällen häufig von demjenigen von Nr. 11072 ab.

Wir möchten somit zu den folgenden Schlußfolgerungen kommen:

1. Wenn wir die therapeutische Wirkung am insuffizienten Herzen als besondere pharmakodynamische Eigenschaft der Herzglykoside betrachten, so genügt der Nachweis der positiven Inotropie bzw. des systolischen Stillstandes nicht, um von Digitalisähnlichkeit reden zu können, da zahlreiche schon eingangs erwähnte Stoffe sowie ein Chinoxalinderivat eine formal mehr oder weniger ähnliche systolische Kontraktur hervorrufen können.

2. Ein gleichsinniges Verhalten eines systolisch wirkenden Pharmakons und von Digitalisglykosiden bei einer Reihe von verschiedenen Teilreaktionen ist ebenfalls ungenügend, um diese besondere Eigenschaft experimentell nachzuweisen und somit eine volle therapeutisch brauchbare digitalisähnliche Herzwirkung zu charakterisieren. Sogar ein Pharmakon wie Nr. 11072, welches bei einer größeren Anzahl von Testobjekten ähnlich wie g-Strophanthin und Cristafolin zu wirken vermag, besitzt diesen therapeutischen Effekt am insuffizienten Herzen noch nicht.

3. Ein ähnliches Verhalten bei einer mehr oder weniger größeren Anzahl von Teilreaktionen ist nicht an eine besondere chemische Struktur gebunden, da Pharmaka, die chemisch so verschieden voneinander sind,

wie z. B. Ascorbinsäure, Schwermetalle, Superoxyde und Chinoxalinderivate, viele gleichsinnige, im einzelnen wohl digitalisähnliche Teilreaktionen hervorrufen können, ohne daß dabei eine therapeutische volle Digitaliswirkung „a priori" vorhanden wäre.

4. Im Falle von Monojodessigsäure sind wohl einige Teilreaktionen ähnlich wie bei den Herzglykosiden, die meisten aber grundsätzlich verschieden. Im allgemeinen ist dazu noch ein erheblicher quantitativer Unterschied vorhanden, indem die Monojodessigsäure erst in hohen Konzentrationen am Herzen wirkt. Die vorwiegend biochemische Arbeitshypothese, daß die volle Wirkung der Herzglykoside durch Hemmung des Kohlehydratstoffwechsels und möglicherweise durch Blockierung gewisser SH-haltiger Enzyme bedingt ist, genügt ebenfalls nicht, um die therapeutische Vollwirkung der Herzglykoside zu erklären, da sie nur gewisse unter vielen verschiedenen Teilreaktionen berücksichtigt.

5. Wenn bei einigen unserer Prüfungen wohl gewisse partielle Ähnlichkeiten zwischen den Herzglykosiden, einem Chinoxalinderivat und einem thiolopriv wirkenden Stoff nachgewiesen wurden, so scheint es doch, daß, um eine volle Digitaliswirkung zu entfalten, ein Herzgift mindestens alle tierexperimentell erfaßbaren Teilwirkungen besitzen muß, welche die Herzglykoside aufweisen. Es sieht auch so aus, als ob bei g-Strophanthin und Cristafolin eine weitere, für die therapeutische Gesamtwirkung der Herzglykoside maßgeblich verantwortliche Eigenschaft vorhanden ist, welche aber durch unsere verschiedenartigen tierexperimentellen Prüfungen nicht erfaßt wurde.

Zusammenfassung.

In einer Reihe von Prüfungen an verschiedenartigen Testobjekten (Kalt- und Warmblüterherz, isoliert und in situ; Wirkung auf die Atmung und die anaerobe Glykolyse des Herzmuskels; Beeinflussung der Herzwirkung durch Ca-Mangel und durch Hypodynamie am isolierten Froschherzen, durch Anoxämie am Warmblüterherzen, durch Cu^{++} am Kalt- und Warmblüterherzen und durch Cystein am Kaltblüterherzen) wurden gewisse Ähnlichkeiten zwischen g-Strophanthin, Cristafolin, einem Chinoxalinderivat (Nr. 11072) und einem thiolopriv wirkenden Stoff (Monojodessigsäure) gefunden.

Gleichsinnige Teilreaktionen bei einzelnen Testobjekten genügen aber nicht, um die Gesamtwirkung der Herzglykoside, insbesondere ihren therapeutischen Effekt am insuffizienten Herzen, tierexperimentell zu charakterisieren.

Wir möchten an dieser Stelle den Herren C. Brüni und E. Wirz unsern Dank für ihre technische Hilfe aussprechen.

Literatur.

[1] Apter, L., R. Ashman and E. Hull: J. of Pharmacol. **82**, 227 (1944). — [2] Bacq, Z. M.: Experientia **2**, 349, 385 (1946). — [3] Bacq, Z. M.: Experientia **5**, 207 (1949). — [4] Bennett, D., and M. B. Chenoweth: Fed. Proc. **10**, 280 (1951). — [5] Bennett, D., K. Pengsritongs, J. R. Weeks and M. B. Chenoweth: J. of Pharmacol. **101**, 2 (1951). — [6] Blavier, J., J. Lecomte et Z. M. Bacq: C. r. Soc. Biol. Paris **143**, 1291 (1949). — [7] Chenoweth, M. B., D. R. Bennett and R. Parry: J. of Pharmacol. **103**, 340 (1951). — [8] Del Castillo—Nicolau J., H. J. Hufschmidt et G. B. Konecci: Experientia **7**, 153 (1951). — [9] Druey, J., u. A. Hüni: Helvet. Chim. Acta **35**, 2301 (1952). — [10] Eichholtz, F.: Heffters Hdb. d. exp. Pharmakologie III/3, 1962 (1934). — [11] Fischer, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **130**, 194 (1930). — [12] Gross, F.: Persönliche Mitteilung. — [13] Hardman, M., D. R. Bennet, J. F. Palmer and M. B. Chenoweth: Fed. Proc. **11**, 354 (1952). — [14] Hatcher, R., and I. Brody: Amer. J. Pharmacy **82**, 360 (1910). — [15] Hoffmann, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **96**, 105 (1923). — [16] Krayer, O., R. Mendez, E. Moisset de Espanés and R. P. Linstead: J. of Pharmacol **74**, 372 (1942). — [17] Krayer, O., R. P. Linstead and D. Todd: J. of Pharmacol. **77**, 113 (1943). — [18] Krayer, O., and G. M. Acheson: Physiologic. Rev. **26**, 383 (1946), — [19] Lendle, L.: Hdb. exp. Pharmacol. Erg. W. I, 11 (1935). — [20] Linstead, R. P., and O. Krayer: Science (Lancaster, Pa.) **95**, 332 (1942). — [21] Loewi, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 131 (1918). — [22] Meier, R., J. Tripod u. E. Wirz: Helvet. Physiol. Acta **7**, 210 (1949). — [23] Meier, R., J. Tripod u. E. Wirz: Arch. internat. Pharmacodynamie **81**, 458 (1950) — [24] Meier, R., u. J. Tripod: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 326 (1952). — [25] Meier, R., u. J. Tripod: Im Druck. — [26] Mendez, R.: J, of Pharmacol. **81**, 151 (1944). — [27] Mendez, R., and B. Peralta: J. of Pharmacol. **90**, 128 (1947). — [28] Reubi, F., u. D. Kirchgraber: Schweiz. med. Wschr. **83**, 241 (1953). — [29] Schoen, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **96**, 158 (1922). — [30] Straub, W.: Biochem. Z. **28**, 392 (1910). — [31] Schueler, F. W., u. C. Hanna: Arch. internat. Pharmacodynamie **86**, 91 (1951). — [32] Tripod, J.: Cardiologia **17**, 310 (1950). — [33] Tripod, J., E. Wirz u. R. Meier: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 51 (1951). — [34] Uhlmann, F., u. F. Nobile: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 189 (1939). — [35] Walther, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 611 (1943). — [36] Wollenberger, A.: J. of Pharmacol. **91**, 39 (1947). — [37] Wollenberger, A.: J. of Pharmacol. **97**, 311 (1949).

Dr. J. Tripod, Wissenschaftl. Laboratorien der Ciba Aktiengesellsch. Basel-Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 290—294 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für medizinische Forschung und Fortbildung an der Justus-Liebig-Hochschule Gießen
(Direktor: Professor Dr. F. Hildebrandt).

Zur Kumulation der Reinglykoside Digoxin, Digitoxin und Boviea.

(Nach Versuchen mit der Brechdosis an der Taube.)

Von
F. Hildebrandt und W. Reinartz.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 2. Mai 1953.)

Hanzlik[1] hat im Jahre 1929 die brechenerregende Wirkung von Digitalisglykosiden an der Taube zu einer Standardisierungsmethode ausgearbeitet. In den hier vorliegenden Untersuchungen sollte nun geprüft werden, ob diese Methode geeignet sei, etwas über die Kumulationseigenschaften von Digitalisglykosiden Auskunft zu geben. Untersucht wurden in diesem Zusammenhang 3 Reinglykoside: Digoxin, Digitoxin und ein solches aus Boviea volubilis*.

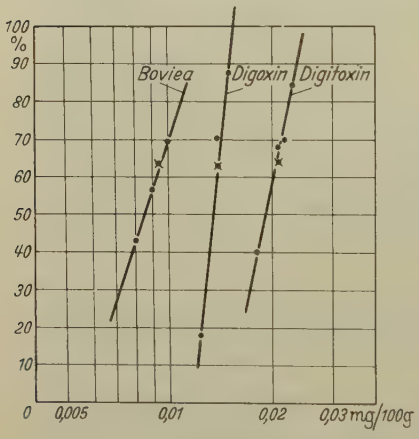


Abb. 1. Dosis-Wirkungskurve für den Brechakt der Taube nach Digoxin, Digitoxin und Bovieaglykosid.

Zu den Versuchen standen insgesamt 75 Tauben zur Verfügung, die unter möglichst guten Bedingungen (großer Freiluftraum, oben durch Drahtgitter abgesperrt) gehalten wurden. Die i. v. Injektionen erfolgten nach den Vorschriften von Wanzlik in die Flügelvene, was bei einiger Übung ohne Schwierigkeiten gelingt. Als Testdosis wurde die Dosis verwandt, die bei rund 2/3 der Tiere Erbrechen hervorruft. Zwischen den einzelnen Injektionen wurde ein Zwischenraum von mindestens 14 Tagen eingeschaltet, um sicher zu sein, daß die Wirkung der Injektion vollkommen abgeklungen war.

Zunächst galt es, für die drei Glykoside die 2/3 Brechdosis festzulegen, da für Digoxin und das Bovieaglykosid die Daten dafür bisher fehlen. In der graphischen Darstellung (Abb. 1) ist das Verhältnis zwischen Dosis

* Digoxin wurde uns freundlicherweise von den Chem. Fabriken Boehringer u. Söhne, Mannheim, Digitoxin von der Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach, und das Glykosid aus Boviea volubulis von Prof. Schenck, Berlin zur Verfügung gestellt, wofür bestens gedankt sei.

(logarithmischer Wert) und dem Prozentsatz der zum Erbrechen kommenden Tauben dargestellt.

Da es sich bei den anschließend zu besprechenden Untersuchungen über die Kumulation um eine möglichst genaue Festlegung der gesuchten Brechdosis handelte, wurde eine große Anzahl von Einzelinjektionen für jedes Glykosid vorgenommen. Der für die nachfolgenden Untersuchungen gesuchte Wert ist auf der Abbildung mit einem Kreuz bezeichnet. Er beträgt für Digoxin 0,014 mg/100 g mit 62,5% Wirkung bei 176 Tieren, bei dem Bovieaglykosid 0,0093 mg/100 g bei 63,5% von 154 Tieren und für Digitoxin 0,021 mg/100 g bei 63,5% von 156 Tieren.

Bei Digoxin und Bovieaglykosid trat das Erbrechen meistens 5 bis 10 min nach der i. v. Injektion auf, bei Digitoxin erfolgte die Reaktion etwas später, meistens um die 15. min herum.

Tabelle 1. *Brechdosis Digoxin 0,014 mg/100 g bei 62,5% (176 Tiere).*

Anzahl der Tiere	Komplementdosis %	Erbrechen Anzahl %	Resultierende Auffülldosis
	Injektion *nach 24 Std*		
12	35	5 = 42%	
6	40	3 = 50%	
6	50	4 = 67%	50%d. Br. D.
	Injektion *nach 2 Tagen*		
10	50	4 = 40%	
18	60	10 = 56%	
12	70	7 = 58%	
12	80	10 = 83%	70% d. Br. D.
	Injektion *nach 3 Tagen*		
20	63	2 = 10%	
12	70	8 = 67%	70% d. Br. D.
	Injektion *nach 4 Tagen*		
12	60	3 = 25%	
12	68	7 = 58%	70% d. Br. D.
	Injektion *nach 5 Tagen*		
8	71	2 = 25%	
12	73	7 = 58%	80% d. Br. D.
	Injektion *nach 7 Tagen*		
12	65	5 = 42%	
12	75	7 = 58%	80% d. Br. D.

Damit war die Basis für die eigentlichen Versuche gegeben. In den nunmehr zu besprechenden Kumulationsversuchen gingen wir folgendermaßen vor: Bei einer ersten Injektion wurde die oben festgelegte

emetische Dosis für 2/3 der Versuchstiere i. v. gegeben. Nach einem oder mehreren Tagen bis zu einer Woche wurde dann die Dosis aufgesucht, die wiederum bei 2/3 der Tiere den Brechakt auslöst, also die sogenannte „Auffülldosis".

Die mit Digoxin gewonnenen Resultate finden sich in Tab. 1.

Aus ihr ist ersichtlich, daß die „Auffülldosis" nach einem Tag nur die Hälfte der normalen Brechdosis beträgt. Nach 2, 3 und 4 Tagen werden rund 70% der Brechdosis als „Auffülldosis" benötigt, nach 5 und nach 7 Tagen 80%. Demnach ergibt sich, daß nach 24 Std noch ein erheblicher Wirkungsrest der Vorinjektion vorhanden ist, daß aber dann die Wirkung der Vorinjektion im wesentlichen abklingt.

Tabelle 2. *Brechdosis Boviea 0.0093 mg/100 g bei 63,5% (154 Tiere).*

Anzahl der Tiere	Komplement-dosis %	Erbrechen Anzahl %	Resultierende Auffülldosis
	Injektion *nach 24 Std*		
12	27	7 = 58%	
12	37	8 = 67%	35% d. Br. D.
	Injektion *nach 2 Tagen*		
12	36	5 = 41%	
10	54	7 = 70%	
9	72	7 = 84%	50% d. Br. D.
	Injektion *nach 3 Tagen*		
12	47	2 = 16%	
12	54	8 = 67%	55% d. Br. D.
	Injektion *nach 4 Tagen*		
10	50	4 = 40%	
12	59	8 = 67%	60% d. Br. D.
	Injektion *nach 5 Tagen*		
12	54	6 = 50%	
8	63	6 = 75%	62% d. Br. D.
	Injektion *nach 7 Tagen*		
12	70	6 = 50%	75% d. Br. D.

Bei dem Bovieaglykosid ist nach 24 Std die Wirkung der Vorinjektion noch bis zu einem gewissen Grad erhalten, denn die „Auffülldosis" beträgt nur 35% der normalen Brechdosis. Nach 2 Tagen werden noch 50% benötigt, und in den folgenden Tagen ist die Wirkung der Vorinjektion langsam weniger nachweisbar, aber doch bis zum 5. Tag noch deutlich vorhanden, um erst am 7. Tag zwar nicht vollständig, aber doch im wesentlichen abzuklingen.

Die stärkste kumulative Wirkung besitzt, wie auch anzunehmen war, Digitoxin.

Tabelle 3. *Brechdosis Digitoxin 0,021 mg/100 g bei 63,5% (156 Tiere).*

Anzahl der Tiere	Komplement-dosis %	Erbrechen Anzahl %	Resultierende Auffülldosis
	Injektion *nach 24 Std*		
6	10	2 = 33%	
12	15	7 = 58%	
6	20	5 = 83%	15% d. Br. D.
	Injektion *nach 2 Tagen*		
6	15	2 = 33%	
12	22	7 = 58%	
7	80	5 = 73%5†	
5	100	5 = 100%3†	22% d. Br. D.
	Injektion *nach 3 Tagen*		
6	32	1 = 17%	
12	44	7 = 58%	
6	57	5 = 83%	44% d. Br. D.
	Injektion *nach 4 Tagen*		
12	52	7 = 58%	
6	60	6 = 100%2†	52% d. Br. D.
	Injektion *nach 5 Tagen*		
12	50	4 = 33%	
6	75	5 = 83%	
6	100	6 = 100%2†	60% d. Br. D.
	Injektion *nach 6 Tagen*		
6	60	3 = 50%	
6	70	4 = 67%	65% d. Br. D.
	Injektion *nach 7 Tagen*		
12	58	6 = 50%	
6	68	4 = 67 %	
6	78	5 = 83%	65% d. Br. D.

Bei ihm genügen schon am ersten Tag 15% der 2/3 Brechdosis als „Auffülldosis". Bei dem Vortasten nach der nötigen „Auffülldosis" gingen bei Anwendung von 100 sowie 80% der Brechdosis als „Auffülldosis" fast alle Tiere ein. Erst bei nur 22% wurde der gesuchte Wert gefunden. Auch nach 3 Tagen lag der gesuchte Wert immer noch bei 44%, um dann in den folgenden Tagen auf 52% und dann schließlich auf 60 bis 65% anzusteigen. Die toxische Wirkung der Vorinjektion bleibt demnach bei Digitoxin sehr lange erhalten.

Aus dem Ansteigen der für die Auslösung des Brechaktes notwendigen prozentualen Dosis kann demnach die Entgiftung der Glykoside ermittelt werden.

Zusammenfassung.

Die Hanzliksche Taubenmethode eignet sich demnach gut zur Beurteilung der Kumulationsfähigkeit von Glykosiden aus der Digitalisreihe. Die Versuche haben ergeben, daß das Lanataglykosid Digoxin von den drei untersuchten Glykosiden die geringste Neigung zur toxischen Kumulation aufweist, während Digitoxin durch eine sehr stark ausgesprochene Nachwirkung charakterisiert ist. In der Mitte zwischen diesen beiden Glykosiden steht das Bovieaglykosid, das etwas stärker kumuliert als Digoxin, aber nicht entfernt so stark wie Digitoxin.

Literatur.

Hanzlik: J. Pharm. exp. Therap. **35**, 363 (1929).

Prof. Dr. F. Hildebrandt, Pharmakol. Inst. der Justus-Liebig-Hochschule, Gießen.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 295—299 (1953).

Aus der Universitätshautklinik Mainz (Direktor: Prof. Dr. E. Keining) und der Universitäts-Hautklinik Göttingen (Direktor: Prof. Dr. H. G. Bode).

Medikamentöse Beeinflussung verschieden bedingter Erytheme.

Von

R. Brett und H. Theismann.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. Mai 1953.)

Zur exakten quantitativen Prüfung ihrer Hyperämiehemmung an der menschlichen Haut wurden drei Gruppen von Pharmaka herangezogen.

1. Vitamine des B-Komplexes,
2. Antihistamine,
3. Pyrazolderivate.

Vor und nach interner Applikation der Prüfsubstanz wurden zwei gleichdosierte Hauterytheme provoziert und ihr Ausmaß bei der gleichen Versuchsperon (VP) prozentual in Beziehung gesetzt. Über methodisches Vorgehen und methodische Verbesserungen haben wir in einer vorangegangenen Arbeit (Brett und Theismann [1]) berichtet. Des öfteren wurde in Paralleluntersuchungen auch die Beeinflussung der Erythemschwelle festgelegt.

1. Die Hemmung der Hyperämie durch Vitamine des B-Komplexes.

Mit mehreren Mitarbeitern haben wir im *Ultraviolettversuch* bei nicht sensibilisierten Menschen unter den geprüften Substanzen des B-Komplexes als wirksam das Nicotinsäureamid, die Folsäure, die Pantothensäure und das Nicofol (Nordmark-Werke) — als Kombination der genannten drei Präparate (Nicotinsäureamid 50 mg, Folsäure 15 mg, Pantothensäure 50 mg) — gefunden. Dagegen war die p-Aminobenzoesäure unwirksam. Weitere Untersuchungen schlossen sich an. Nach Vorbehandlung mit der Prüfsubstanz wurde die Hauterythemschwelle, bezogen auf die Konzentration von 0,5% Senföl, das auf die Haut gebracht wurde, bei Pantothensäure (Bepanthen „Hofmann-La Roche" 200 mg i. m.) um 4—22%, bei Nicotinsäureamid (NSA „Bayer" 100 mg i. m.) um 18—23%, bei Folsäure (FS „Geigy" 50 mg i. m.) um 23—50%, bei Nicofol (1 Amp. i. v.) um 64—178% heraufgesetzt. Hieraus ergibt sich, daß die Zeitspanne, die zwischen dem Beginn der Senföleinwirkung

und dem Eintritt der Hautrötung liegt, unter dem Einfluß der obengenannten Vitamine vergrößert wird (etwa 1000 Messungen).

Nach unserer Methodik (Brett und Theismann [1]) ergeben sich bei Remissionsmessungen von ultravioletten gesetzten Erythemen nach Beeinflussung durch Nicofol Werte, wie in der Abb. 1b sichtbar. Das heißt, Nicofol kann das UV-Erythem um fast 50% hemmen.

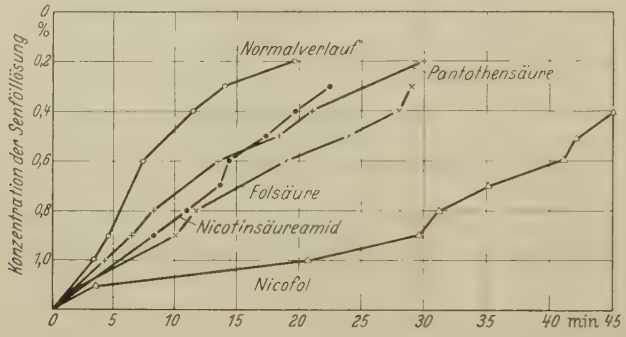


Abb. 1a. Beeinflussung der *Erythemschwelle* eines Senfölerythems nach Vorbehandlung mit Nicotinsäureamid, Pantothensäure, Folsäure und Nicofol, errechnet aus den Mittelwerten. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: Konzentration der Senföllösung.

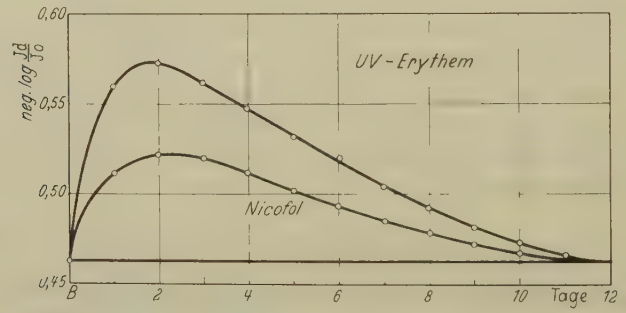


Abb. 1b. Beeinflussung des UV-Erythems durch Nicofol „Nordmarkwerke" (50 mg Nicotinsäureamid, 15 mg Folsäure, 50 mg Pantothensäure). Abszisse: Zeit in Tagen. Ordinate: (neg. log I_t/I_0) relative Durchblutungsgröße.

2. Die Hemmung der Hyperämie durch Antihistamine.

Über die Hemmung des UV-Erythems durch AH haben wir kürzlich berichtet (Brett und Theismann [2]). In einer größeren Versuchsreihe haben wir den Antihistamineffekt auf die Hautdurchblutung bei verschiedenen Hauttemperaturen geprüft.

Einmal kamen Temperaturen in sicher physiologischem Bereich zur Anwendung (32°, 35°, 38°). Weiter wurden auch Hauterwärmungen durchgeführt, die oberhalb der physiologischen Körpertemperatur lagen (42°, 45°, 48°). In dem Temperaturbereich von 32—38° wurden insgesamt 3 Gruppen zu je 10 VP untersucht, bei 42—48° waren es je Gruppe 15 VP. Insgesamt wurden 2000 Einzel-

messungen durchgeführt. Zur Untersuchung kam die Beugeseitenhaut der Unterarme in Ellbogennähe. Die Erwärmung bzw. Abkühlung geschah in einem Wasserbade. Der Arm wurde 15 min lang bis zum Oberarm eingetaucht. Die Temperatur des Wassers wurde thermoelektrisch kontrolliert und bis auf $\pm 1/4°$ konstant gehalten. Bei den höchsten Temperaturen lag die Hauttemperatur bis $^3/_4°$ niedriger als die Wassertemperatur. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß bei gesunden VP bei gleicher Erwärmung der beiden Unterarme die Hautrötung identisch abläuft. Weiter ließen sich bei Durchführung der Messung zur gleichen Tageszeit, bei 1stündiger Lagerung beider Arme der VP senkrecht zur Körperachse vor Versuchsbeginn und bei Innehaltung konstanter Raumtemperatur bei derselben VP an verschiedenen Tagen übereinstimmende Versuchsergebnisse erzielen. Die Rötung wurde nach dem von Bode erstmalig angegebenen Prinzip der direkten Lichtremissionsmessung und unserer eigenen Modifikation (Theismann u. Brett [1]) bestimmt. Die Hautfarbenmessung erfolgte vor der Erwärmung bzw. Abkühlung und nach Herausnahme aus dem Wasserbade im Abstande von jeweils 2–3 min bis zum Abklingen der Rötung.

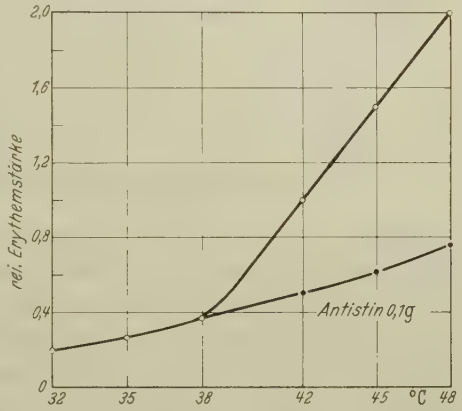


Abb. 2. Beeinflussung des Wärmeerythems durch Antistin „Ciba" (2-phenylbenzylaminomethyl-Imidazolin). Abszisse: Temperaturgrad, Ordinate: relative Erythemstärke.

Nachdem am ersten Untersuchungstag die reine Wärmewirkung gemessen war, wurde am nächsten Tag der Ablauf des Wärmeerythems unter dem Einfluß von 200 mg Antistin „Ciba" (2-phenylbenzylaminomethyl-Imidazolin) gemessen, das 2 Std vor Versuchsbeginn intramuskulär gegeben worden war. Im Bereich der physiologischen Temperaturstufen (32—38°) hatte das AH keinen Effekt auf die Hauterytheme. Anders verhielt sich die hyperämische Reaktion auf höhere Temperaturen. Es ergab sich ein deutlicher Effekt des Antistins im Sinne einer Hemmung des Wärmeerythems. Untersuchungen des reinen Wärmeerythems zeigten, daß sich die Wärmeerytheme bei 42°, 45° und 48° in ihrer Intensität wie 1,0:1,5:2,3 verhalten. Die Hemmung betrug bei Behandlung mit Antistin bei den 42° Erythemen: 50%, bei den 45° Erythemen: 60% und bei den 48° Erythemen: 70%. Die gehemmten Erytheme bei 42°, 45° und 48° verhalten sich wie 0,52:0,61:074. Bei den gehemmten Erythemen tritt also der Temperaturunterschied, durch den diese Erytheme hervorgerufen werden, wesentlich geringer in Erscheinung (Abb. 2).

Zwei verschiedene Antihistamindosen kamen unter anderem beim Trafuril-Erythem zur Anwendung. 2 Tropfen der 0,1%igen Trafuril-Lösung „Ciba" (Tetrahydrofurfurylester der Nicotinsäure) wurden inner-

halb eines vorher auf die Haut gezeichneten Kreises von 4 cm Durchmesser 2 sec lang mit dem Zeigefinger unter leichtem Druck eingerieben. Voruntersuchungen hatten ergeben, daß wir dabei an symmetrischen Stellen beider Unterarme innerhalb der Fehlergrenze der Meßmethode reproduzierbare Erythemverläufe erhielten. 2 cm³ Luvistin „Böhringer

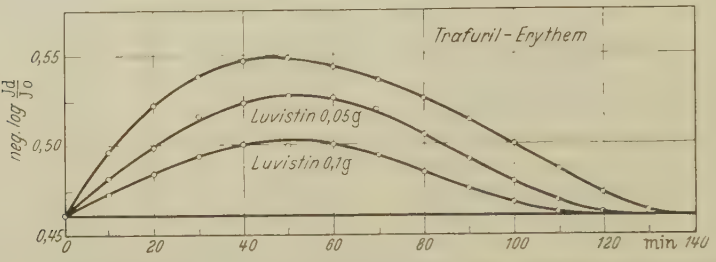


Abb. 3. Beeinflussung des Trafuril (Tetrahydrofurfurylester der Nicotinsäure) -Erythems durch verschieden dosiertes Luvistin (pyrolidyl-äthyl-phenyl-Benzylamin).

u. Söhne“ (pyrolidyl-äthyl-phenyl-Benzylamin) mit 0,05 g Substanz 2 Std vor Versuchsbeginn intramuskulär injiziert bewirkten eine Hemmung auf 70%, 4 cm³ mit 0,1 g auf 45%. (Die Untersuchungen wurden an 40 VP gemacht bei 4000 Einzelmessungen.) Abb. 3.

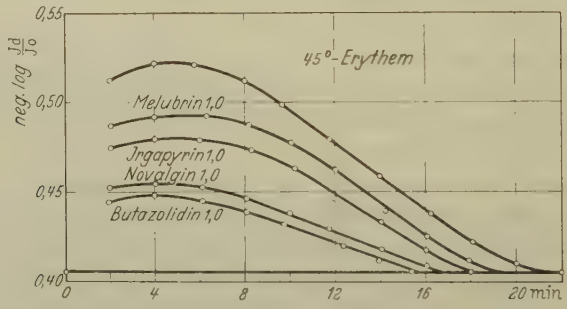


Abb. 4. Beeinflussung des Wärmeerythems (45°) durch verschiedene Substanzen aus der Reihe der Analgetica. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: relative Durchblutungsgröße.

3. Die Hemmung der Hyperämie durch Pyrazolderivate.

Analog den Versuchen von Wilhelmi am Tier konnten wir auch an der menschlichen Haut die sehr deutliche Hemmung des UV-Erythems durch Irgapyrin „Geigy“ (3, 5-dioxy-1, 2-diphenyl-4-n-butyl-pyrazolidin-Natrium—Dimethylamino-Phenyldimethyl-pyrazolon zu gleichen Teilen) bestätigen. Eine Dosis von 5 cm³ Irgapyrin mit 1,5 g Substanz, 1 Std vor Versuchsbeginn intramuskulär injiziert, bewirkte eine Hemmung auf 50—70% (20 VP mit 2000 Einzelmessungen). Am 45°-Wärmeerythem (Versuchsanordnung wie oben beschrieben) prüften wir die Wirksamkeit verschiedener Pyrazolderivate bei 60 VP mit 6000 Einzeluntersuchungen.

(Es wurde jeweils 1 g Substanz 1 Std vor Versuchsbeginn intramuskulär injiziert.)

Melubrin „Hoechst" (phenyldimethylpyrazolonaminomethan-sulfosaures Natrium) bewirkte eine Hemmung auf 65,5%, Irgapyrin auf 58%, Novalgin „Hoechst" (phenyldimethylpyrazolon-methylamino-methansulfosaures Natrium) auf 42,8%, Butazolidin-Na „Geigy" (3, 5-dioxy-1, 2-diphenyl-4-n-butylpyrazolidin-Natrium) auf 39%. Um Kumulationseffekte auszuschließen, wurden zwischen den Versuchen mehrtägige Pausen eingelegt und die Reihenfolge der Präparate ständig geändert (Abb. 4).

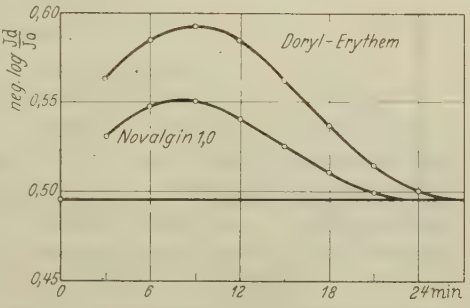


Abb. 5.
Beeinflussung des Doryl (Carbaminooxylcholinchlorid) -Erythems durch Novalgin (phenyldimethylpyrazolon-methylaminomethansulfosaures Natrium).
Abszisse: Zeit in Minuten,
Ordinate: relative Durchblutungsgröße.

Bei 40 VP und 4000 Einzelmessungen wurde die Wirksamkeit von 1 g Novalgin, 1 Std vor Versuchsbeginn intramuskulär injiziert, am iontophoretisch erzeugten Dorylerythem gemessen: Es trat Hemmung auf 48% ein. Es wurde die 0,025%ige Doryllösung „Merck" (Carbaminooxylcholinchlorid) verwandt (Abb. 5).

Diskussion der Ergebnisse.

Eine Reihe von Substanzen aus drei verschiedenen pharmakologischen Gruppen zeigten eine gemeinsame Eigenschaft: Sie sind in der Lage, Hauthyperämien verschiedener Genese zu hemmen. Die normale Hautdurchblutung wird nicht beeinflußt. Unter Einwirkung dieser Substanzen ist die Hemmung der Hyperämie abhängig 1. von der Dosierung des Pharmakons, 2. von dem Ausmaß der Hyperämie. Bei einigen Pyrazolderivaten wird gezeigt, daß geringe chemische Abwandlungen deutliche Wirksamkeitsunterschiede zur Folge haben. Bezogen auf die Unverträglichkeit erreichen kleine Dosen von Pyrazolderivaten den gleichen Effekt wie mittlere Antihistamingaben.

Literatur.

Bode, H. G.: Strahlentherap. **43**, 565 (1932). — Brett, R., u. H. Theismann: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — Brett, R., u. H. Theismann: (2) Strahlentherap. (im Druck). — Wilhelmi, G.: Schweiz. med. Wschr. **79**, 577 (1949); **80**, 936 (1950).

Dr. H. Theismann, Universitäts-Hautklinik Göttingen.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 300—316 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst.

Über ein neues Leitungsanaesthetikum der „Nirvanin"-Reihe mit großer Entgiftungsgeschwindigkeit (Hostacain).

Von

LEOPOLD THER.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. April 1953.)

Die Tatsache, daß das Novocain (Procain) als Infiltrations- und Leitungsanaesthetikum seine große praktische Bedeutung vor allem seiner geringen Giftigkeit verdankt, hat uns veranlaßt, unter zahlreichen lokalanaesthetisch wirksamen Stoffen verschiedenster chemischer Konstitution nach einem Leitungsanaesthetikum zu suchen, welches das Novocain in bezug auf *Schnelligkeit des Eintritts* und *Tiefe der lokalanaesthetischen Wirkung* übertrifft, ohne daß die Verstärkung der Wirkung — wie dies leider bei vielen Mitteln unseres Arzneimittelschatzes der Fall ist — durch Erhöhung der Toxizität erkauft wird. Die in der Regel zu beobachtende enge Beziehung zwischen Toxizität (bei intravenöser Injektion!) und Wirkung (als Leitungsanaesthetikum) ließ es zwar zunächst als Utopie erscheinen, nach einem im Vergleich zu Novocain stärker wirksamen Leitungsanaesthetikum zu suchen, das eine geringere Toxizität als Novocain aufweist, da ja die lebenswichtigen nervösen Zentren in ähnlicher Weise wie der periphere Nerv betroffen werden. Allerdings muß man eine Annahme gelten lassen, nämlich die, daß Präparate zu finden sind, die verschieden rasch vom Organismus eliminiert werden und so bei richtiger Anwendung (bei subcutaner Injektion!) auf irgend eine Weise *schneller ausgeschieden oder zerstört werden.* Wenn die Entgiftung im Organismus sehr rasch erfolgt, so besteht die Möglichkeit, daß bei subcutaner Anwendung, die eine langsame Resorption garantiert, im Blut nicht die Konzentration erreicht wird, die zu einer allgemeinen Vergiftung führt. Erfolgt die Entgiftung außerdem erst im Blut oder in den Organen (Leber), so bleibt am Applikationsort die durch das Leitungsanaesthetikum hervorgerufene Analgesie vollkommen *unbeeinflußt.*

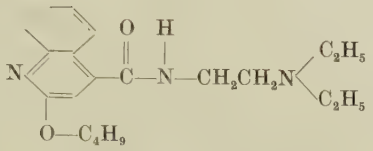
Die geringe Giftigkeit von Novocain und anderen lokalanaesthetisch wirksamen Estern beruht auf der Spaltung, die das Molekül im Organismus durch Esterasen erfährt; die Spaltungsgeschwindigkeit und das Schicksal der Spaltprodukte sind eingehend studiert worden. Über das Schicksal der Lokalanaesthetica, bei denen die Seitenkette mit dem

aromatischen Kern durch eine „Peptid"-ähnliche Bindung verknüpft ist, wissen wir wenig. Die Lokalanaesthetica mit einer Peptid-ähnlichen Bindung lassen sich grundsätzlich in 2 Typen einteilen:

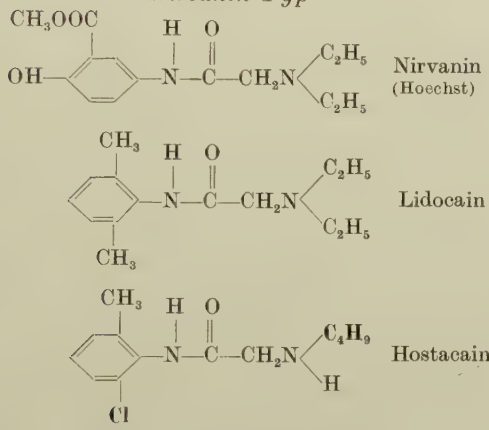
1. solche, bei denen der aromatische Kern die Carboxylgruppe trägt (*Typus Percain*) und

2. solche, bei denen die Aminogruppe am aromatischen Teil des Moleküls steht (*Typus Nirvanin*).

Percain-Typ



Nirvanin-Typ



Bereits vor 50 Jahren haben die Chemiker Einhorn und Oppenheimer das Nirvanin, ein stark wirksames, relativ wenig giftiges Lokalanaesthetikum, synthetisiert, das vom Pharmakologen Heinz (Erlangen) untersucht wurde und gegenüber dem damals allgemein gebräuchlichen Cocain zahlreiche Vorzüge aufwies; erst 1946 hat Loefgren erneut diesen Verbindungstypus aufgegriffen und zahlreiche Verbindungen hergestellt, die zum Teil ebenfalls beachtliche lokalanaesthetische Wirkungen zeigten, wenn auch — wie im Falle des Lidocain — die Verstärkung der Wirkung im Vergleich zu Procain mit einer wesentlichen Erhöhung der Toxizität einhergeht.

Die Stabilität der — *HNCO* — *Bindung* bringt sicherlich nicht nur Vorteile; wahrscheinlich beruht das geringe Eliminationsvermögen des Organismus für Lidocain darauf (Harnisch), daß es entweder nur in ganz geringem Ausmaß oder überhaupt nicht von den Fermenten des Körpers gespalten wird. Die Stabilität der — HNCO — Bindung im Organismus, die von Mc Mahon und Woods für das Lidocain sichergestellt wurde,

ist deshalb nicht überraschend, da ja Grassmann[1] gezeigt hat, daß ein Substrat (z. B. ein Dipeptid) nur dann durch Fermente (Dipeptidasen) gespalten wird, *wenn bestimmte chemische Konfigurationen erfüllt sind.* Da bei einer bestimmten chemischen Konstitution die Möglichkeit einer fermentativen Spaltung eines Lokalanaesthetikums vom Nirvanin-Typus bestand, haben wir zahlreiche Substanzen, die in unseren pharmazeutischen Laboratorien unter der Leitung von Prof. Ehrhart von den Chemikern Dr. Aumüller, Dr. Stein und Dr. Ruschig synthetisiert wurden, nicht nur auf ihre lokalanaesthetische Wirkung, sondern auch auf ihre Entgiftungsgeschwindigkeit untersucht und gefunden, daß ein Präparat, das *Hostacain* (Hoechst 13233), den von uns gestellten Anforderungen entsprach. Hostacain, dessen chemische Formel wir oben wiedergegeben haben, ist das Hydrochlorid des ω-n-Butylamino-essigsäure-2-methyl-6-chloranilid; das Hydrochlorid ist ein weißes kristallinisches Pulver. Sein Schmelzpunkt beträgt 232°; es ist in Wasser neutral löslich und wird durch Kochen in Wasser nicht zersetzt. Über seine pharmakologischen Eigenschaften wird in den folgenden Kapiteln berichtet.

Um ein Maß für die Größe der Eliminationsgeschwindigkeit der untersuchten Lokalanaesthetica zu erhalten, haben wir die *intravenöse Dauerinfusion* als unmittelbare Methode zur Bestimmung der Entgiftungsgsechwindigkeit gewählt und nicht das häufig zur Bewertung der Eliminationsgeschwindigkeit herangezogene Verhältnis derjenigen Dosen eines Mittels, die bei subcutaner und intravenöser Injektion den Tod herbeiführen; nur zu häufig können Wechselbeziehungen zwischen chemischer Substanz und Gewebe am Applikationsort (Ausfällungen, Reizerscheinungen) eine Entgiftung dort vortäuschen, wo in Wirklichkeit eine Resorptionsverzögerung vorliegt. Da wir nach einem *Leitungsanaesthetikum* suchten, kamen als pharmakologische Testreaktionen nur solche Methoden in Frage, die eine quantitative *Abschätzung der Wirkung als Leitunsanaesthetikum* gestatten. Die häufig zur Bewertung herangezogene Prüfung am Kaninchenauge nach Regnier gibt in diesem Fall keine zuverlässigen Resultate, da das Leitungsanaesthetikum Novocain bei Prüfung nach dieser Methode von zahlreichen belanglosen Stoffen übertroffen wird, ohne daß dieser Werteinstufung die geringste Bedeutung zukommt[2], weil Leitungsanaesthetica, wie schon Fromherz vor 25 Jahren berichtete, nicht mit einer Methode zur Bestimmung der oberflächenanaesthetischen Wirkung bewertet werden dürfen.

I. Die lokalanaesthetische Wirkung.

Die Prüfung erfolgte zunächst am freipräparierten *Froschischiadicus* dekapitierter Frösche, weil diese einfache Methode in der Hand des mit ihr Vertrauten sehr gute Resultate gibt. Kleine Wattestückchen wurden zu diesem Zweck mit der jeweils zu untersuchenden Lösung getränkt und schonend um den Ischiadicusnerv gelegt. Durch leichtes Kneifen der Zehen, das alle 3 min erfolgt, wurde die Zeit bis zum

[1] Flaschenträger: Physiologische Chemie I. Springer Verlag, Berlin 1951.

[2] Zur Frage der Methodik haben wir in der Z. Arzneimittelf. **3**, 345 (1953) ausführlich Stellung genommen.

Eintritt einer vollkommenen Unterbrechung der nervösen Leitung festgestellt. Die Ergebnisse, welche an einem großen Tiermaterial gewonnen wurden, haben wir in der Abb. 1 graphisch dargestellt. Die Verteilungskurven werden erhalten, wenn man in ein Koordinatensystem als Abscisse die Zeit und als Ordinate den Prozentsatz der Versuche aufträgt, bei denen innerhalb einer bestimmten Zeit die nervöse Leitung erloschen war.

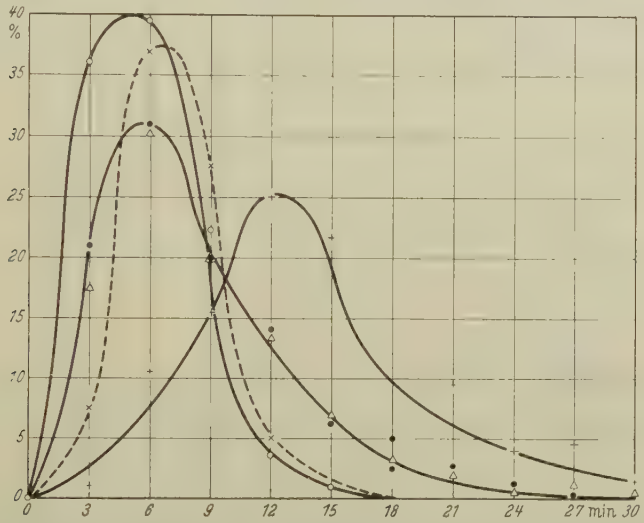


Abb. 1. Wirkung der Lokalanaesthetika Pantocain (0,05%) × × ×, Lidocain (0,25%) △ △ △, Hostacain (0,25%) ○ ○ ○, Procain (1%) • • • und Procain (0,5%) + + + auf die Unterbrechung der nervösen Leitung im Froschischiadikus. Abszisse Zeit, innerhalb welcher bei einem bestimmten Prozentsatz der Versuche (Ordinate) die Leitung unterbrochen ist.

Obwohl kein einheitliches Tiermaterial (in bezug auf Geschlecht und Tiergröße) verwendet wurde, liegen annähernd Normalverteilungen vor. Die am weitesten nach links verschobene Hostacain-Kurve wurde aus 170 Versuchen mit einer 0,25%igen Hostacain-Lösung ermittelt; sie zeigt, daß bereits bei 75% der Tiere innerhalb von 6 min eine vollkommene Leitungsunterbrechung eingetreten ist; Versuche mit einer gleich konzentrierten (und ungefähr auch gleich molaren) Lidocain-Lösung zeigten ebenso wie Versuche mit einer 1%igen Procain-Lösung, daß in der gleichen Zeit von 6 min nur in etwa 50% ein Erlöschen der sensiblen Leitung festgestellt werden konnte. Die Kurve mit der 0,25%igen Lidocain-Lösung wurde aus 348 Versuchen, die Kurve der 1%igen Procain-Lösung aus 289 Versuchen und die Kurve der 0,5%igen Procain-Lösung, die am weitesten nach rechts verschoben ist, aus 200 Versuchen ermittelt. Nach wie vor zeigt das Pantocain als Leitungsanaesthetikum die rascheste Eintrittsgeschwindigkeit; eine 0,05%ige Pantocain-Lösung besitzt die Wirkung einer 0,25%igen Lidocain- und einer 1%igen Procain-Lösung. Wenn man die Konzentration der Lösung, die in einer bestimmten Zeit die nervöse Leitung unterbricht, als Maß für die Wirkungsstärke eines Lokalanaesthetikums zugrunde legt, ist das Hostacain dem Procain in diesem Test am Froschischiadicus deutlich überlegen und übertrifft sogar das Lidocain.

Als eine weitere Methode zur quantitativen Einstufung der Leitungsanaesthetica wurde eine von uns seit langem als brauchbar erwiesene „Alles oder Nichts"-*Methode am Mäuseschwanz*[1] herangezogen. Diese Methode berücksichtigt zum Unterschied vom Test am Froschischiadicus die Durchblutungsverhältnisse am lebenden Säugetier. Jedes Tier einer Gruppe von 10 Mäusen wurde zunächst auf seine Schmerzempfindlichkeit mit der bekannten Brennstrahl-Methode geprüft. Die Lampe wurde so eingestellt, daß unbehandelte Tiere innerhalb einer

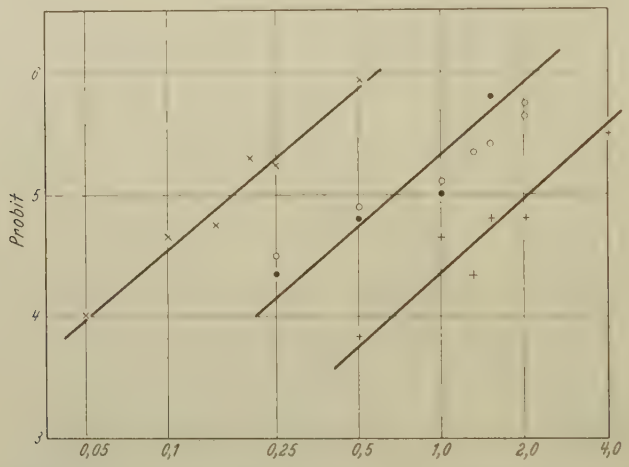


Abb. 2. Wirkung der Lokalanaesthetika Pantocain × × ×, Hostacain ○○○, Lidocain ••• und Procain + + + im Mäuseschwanztest. Injizierte Menge 0,1 cm³. Abszisse: log-Konz. in %. Ordinate: Prozentsatz der Mäuse, bei denen die Schmerzempfindung ausgeschaltet ist.

Zeitspanne von 10 sec den Schmerzreiz mit einer Schmerzreaktion beantworteten. Das Leitungsanaesthetikum (0,1 cm³) wurde nach der Vorprüfung bilateral in die Gegend der Schwanzwurzel injiziert, um die dort verlaufenden Nerven zu blockieren. 10 min nach dieser Injektion erfolgte die Prüfung der Schmerzempfindung in gleicher Weise wie bei der Vorprüfung; die Brennstellen lagen etwa 1,5 cm distal von der Injektionsstelle. Als „positiv" wurden alle Tiere bewertet, die in diesem Versuch eine Brenndauer von 15 sec aushielten, ohne eine Schmerzreaktion zu zeigen. Aus der Prozentzahl der „positiv" reagierenden Tiere (Gesamtzahl der Versuchstiere = 100) lassen sich „probit"-Werte berechnen, die als Ordinate, zur log-Konzentration als Abscisse in Abb. 2 graphisch dargestellt wurden.

[1] Siehe Anmerkung S. 302. Eine Methode zur Auswertung der Lokalanaesthetika am Rattenschwanz wurde von F. Herr und Mitarb. in Naunyn-Schmiedebergs Arch. **217**, 307 (1953) bereits vor unserer Mitteilung (Arzneimittelf. **3**, 346 (1953) veröffentlicht.

Auch mit dieser Methode erwies sich das Pantocain als das stärkste der untersuchten Leitungsanaesthetica. Es übertrifft das Standardpräparat Procain, das erst in etwa 10facher Konzentration die gleiche Wirkung hervorruft. Die Hostacain- und Lidocain-Werte streuen um eine Gerade. Man kann die beiden Leitungsanaesthetica Hostacain und Lidocain als gleich stark wirkend annehmen. Sie übertreffen beide etwa um das $2\frac{1}{2}$fache bis $3\frac{1}{2}$fache die Wirkungsstärke des Procains, ein Befund, der sich mit den Untersuchungen von Herr u. Mitarb. deckt.

Die Messung der *infiltrationsanaesthetischen Wirkung* wurde an der Meerschweinchenquaddel durchgeführt[1]. Als Versuchstiere dienten 250 bis 300 g schwere Meerschweinchen, denen je 0,1 cm³ der Lösung des Leitungsanaesthetikums bilateral symmetrisch in die Haut der Flanke

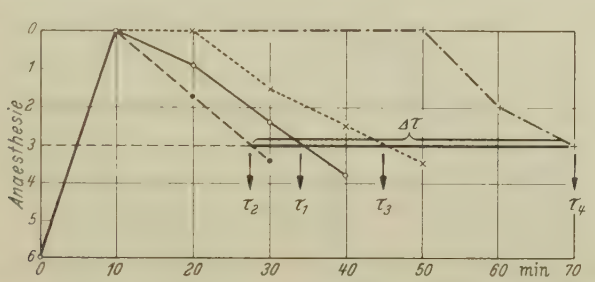


Abb. 3. Bestimmung der Anaesthesiedauer einer Meerschweinchenquaddel durch Ermittlung der Halbwertszeit τ; τ_1 = Procain 0,5%; τ_2 = Hostacain 0,1%; τ_3 = Hostacain 0,25%. Mittelwertskurven aus 12 Versuchen an 36 Tieren. τ_4 = Hostacain 0,1% + Suprarenin 0,2 γ/0,1 cm³. $\Delta\tau = (\tau_4 - \tau_2)$ ist die Verlängerung der Anaesthesiedauer durch Suprarenin.

als intracutane Quaddel injiziert wurde. Die Prüfung erfolgte in Abständen von 10 min. Die Dauer der anaesthetischen Wirkung wurde durch graphische Bestimmung der Halbwertszeit τ ermittelt, die wir als diejenige Zeit definierten, welche vom Beginn der Injektion der Quaddel bis zu dem Zeitpunkt verstreicht, in dem von 6 Stichreizen (mit einer 12er Nadel) bereits 3 „positiv", d. h. mit Quietschen von den Tieren beantwortet wurden. Zu jedem Versuch wurden 3 Meerschweinchen verwendet. In Abb. 3 ist als Abscisse die Zeit, auf der Ordinate eine Wirkungsskala aufgetragen, in der 0 vollkommene Anaesthesie und 6 vollkommene Empfindlichkeit bedeutet. Im ersten Falle wurde von 6 Stichreizen kein einziger, im zweiten Falle wurden von 6 Stichreizen alle 6 mit einer Schmerzreaktion beantwortet.

Aus Abb. 3 geht hervor, daß eine 0,1%ige Hostacain-Lösung (τ_2) annähernd die Wirkung einer 0,5%igen Procain-Lösung (τ_1) erreicht. Eine 0,25%ige Hostacain-Lösung führt bereits zu einer wesentlich länger andauernden Anastehesie (τ_3). In der Abb. 4 haben wir als Ordinate die τ-Werte, als Abscisse die Konzentration des applizierten Lokalanaesthetikums graphisch dargestellt. Jeder Punkt dieser Kurve wurde aus

[1] Siehe Anmerkung S. 302.

Mittelwerten (3 Tiere) gebildet. An Hand des Kurvenverlaufs kann ähnlich wie beim Pantocain und Novocain gezeigt werden, daß mit Erhöhung der Konzentration die Anaesthesiedauer nur in einem bestimmten Dosenbereich zunimmt, und daß oberhalb desselben auch eine Vervielfachung der Dosierung keine Verlängerung der Anaesthesiedauer mehr bewirkt[1]. Aus den Versuchen mit Hostacain, die in Abb. 4 wiedergegeben sind, geht hervor, daß bereits bei einer Konzentration von 0,25% das Maximum der Anasethesiedauer erreicht wird.

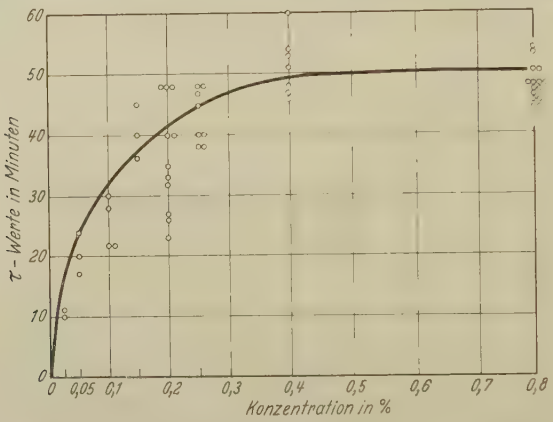


Abb. 4. Abhängigkeit der Anaesthesiedauer von der Konzentration der Hostacain-Lösung. (τ-Werte gemessen an der Meerschweinchenquaddel.)

Eine Verlängerung über dieses Maximum der Anaesthesiedauer hinaus ist nur durch Zusatz eines gefäßkontrahierenden Stoffes zu erreichen.

Um den Einfluß der *gefäßkontrahierenden Stoffe* kennenzulernen, haben wir Versuche an der Meerschweinchenquaddel mit verschieden konzentrierten Hostacain-Lösungen (0,1, 0,2, 0,4%) durchgeführt, denen verschieden große Suprarenin-Mengen zugesetzt wurden. Als $\Delta\tau$ bezeichneten wir (s. Abb. 3) die durch den gefäßkontrahierenden Stoff bedingte zusätzliche Verlängerung der Anaesthesiedauer. Auch diese Versuche zeigten, daß *unabhängig* von der Konzentration der Hostocain-Lösung die Anaesthesiedauer nur in einem bestimmten Dosenbereich mit der Menge des zugesetzten gefäßkontrahierenden Stoffes zunimmt. Aus Abb. 5 geht hervor, daß mit dem Zusatz von 2 γ Suprarenin zu 0,1 cm³ der Lösung bereits das Maximum (d. h. eine zusätzliche Verlängerung $\Delta\tau$ der Anaesthesie von etwa 90 min) bei allen angewendeten Hostacain-Lösungen erreicht ist und daß bei einer weiteren Verstärkung des Suprarenin-Zusatzes keine wesentliche Verlängerung der Anaesthesiedauer mehr zu erzielen ist, wohl aber mit einer Erhöhung der Toxizität des Hostacain-Suprarenin-Gemisches gerechnet werden muß.

Nachdem die Untersuchungen über die leitungs- und infiltrationsanaesthetische Wirkung ergeben hatten, daß Hostacain die Wirkung

[1] Die Dosen-Wirkungsbeziehung der Lokalanaesthetica wird an anderer Stelle besprochen.

des Procains um ein Vielfaches übertrifft, war es sehr überraschend, daß es an der Kaninchen-Cornea nicht einmal die Wirkung von Procain erreicht. Nach der Methode von Regnier an der Kaninchen-Cornea (Abb. 6) erwies sich Hostacain als nur etwa $\frac{1}{2}$ so stark wirksam wie Procain und stellt demnach *kein Oberflächenanaesthetikum* dar. Den Anspruch, ein brauchbares Oberflächenanaesthetikum zu sein, darf zunächst keines der Präparate der Nirvanin-Reihe erheben, auch wenn einige von ihnen im Regnier-Test das Procain übertreffen. Seit der Einführung

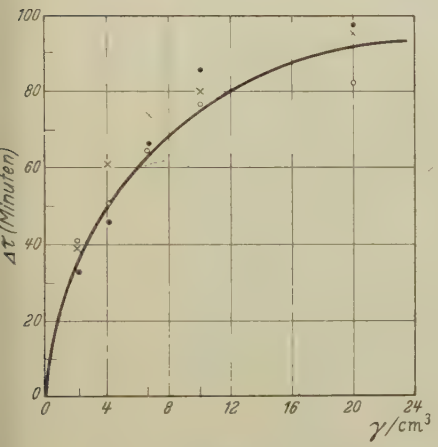


Abb. 5.

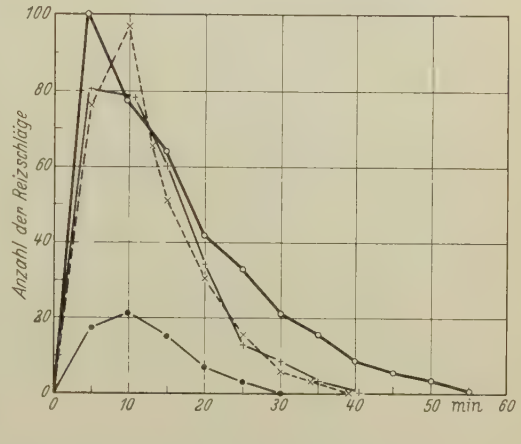


Abb. 6.

Abb. 5. Abhängigkeit der durch Suprarenin-Zusatz bedingten Verlängerung der Anaesthesiedauer (Ordinate) von der Suprarenin-Konzentration (Abszisse). Versuche an der Meerschweinchenquaddel. Hostacain 0,4% ○○○, 0,2% × × ×, 0,1% • • •

Abb. 6. Bestimmung der oberflächenanaesthetischen Wirkung nach Regnier am Kaninchenauge. Pantocain 0,01% ○○○, Procain 1% +++, Hostacain 1% •••,, und 2% × × ×.

des Pantocain haben sich alle Präparate, die nicht die gleiche Wirkungsstärke wie dieses Standardpräparat der Oberflächenanaesthesie besitzen, in der Klinik als mehr oder weniger untauglich erwiesen. Bei den hohen Anforderungen, die die Chirurgie und andere Disziplinen an ein Oberflächenanaesthetikum stellen, muß von vornherein jedes Mittel ausscheiden, das nicht die Wirkungsstärke des Pantocain erreicht.

II. Toxicität.

Neben der Bestimmung der lokalen Wirkungsstärke haben wir der Ermittlung der Toxizität besondere Sorgfalt gewidmet. Zur Bestimmung der absoluten Toxizität wählten wir die *intravenöse Injektionstechnik* an der weißen Maus, weil diese von der Resorptionsgeschwindigkeit unabhängig ist. Die Injektion wurde mit möglichst gleichmäßiger Geschwindigkeit vorgenommen. Zum Vergleich an unserem Mäusematerial

(20—30 g schwere Mäuse beiderlei Geschlechts) wurden Lidocain, Pantocain und Procain herangezogen. In Abb. 7 sind die Versuche graphisch dargestellt; als Abscisse ist die log-Dosis, als Ordinate der Prozentsatz der getöteten Tiere (Probit-Einheiten) aufgetragen. Als LD_{50} ließen sich für Pantocain etwa 10 mg/kg, für Lidocain und Hostacain etwa 35 mg/kg und für Procain etwa 75 mg/kg ermitteln. Vergleicht man Abb. 7 mit Abb. 2, so sieht man, daß bei der intravenösen

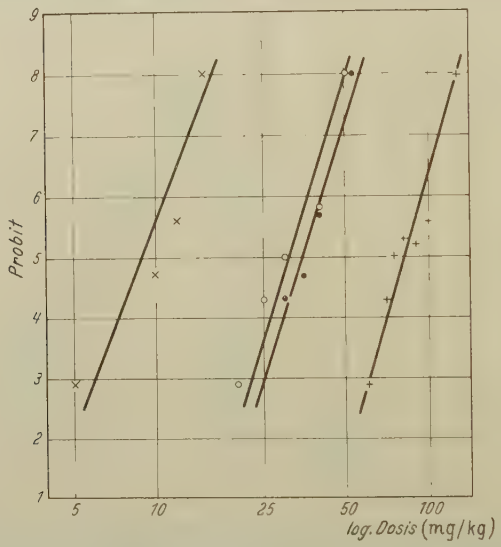


Abb. 7. Bestimmung der Toxicität an der weißen Maus nach intravenöser Injektion. Pantocain × × ×, Hostacain ○○○, Lidocain •••, Procain +++.

Toxizität und der leitungsanaesthetischen Wirkung die gleiche Reihenfolge der untersuchten Stoffe vorliegt, da ja der periphere Nerv in ähnlicher Weise wie die lebenswichtigen Zentren von der Anaesthesie betroffen wird. Das Wirkungsverhältnis ist:

$$Pantocain > Lidocain \triangleq Hostacain > Procain.$$

Man könnte nun erwarten, daß auch die *subcutane Toxizität*, die ebenfalls an Mäusen bestimmt wurde, ein ähnliches Wirkungsverhältnis zeigen würde. Es war überraschend (Abb. 8), daß bei dieser Applikationsart das Hostacain in seiner Toxizität nicht mehr dem Lidocain, sondern dem Procain glich. Die Reihenfolge in bezug auf toxische Wirkung war:

$$Pantocain > Lidocain > Procain = Hostacain.$$

Wenn ein Präparat wie das Hostacain, das sich als Leitungsanaesthetikum in allen Testen um ein Vielfaches stärker erwiesen hat als das

Procain, bei subcutaner Applikation sogar etwas weniger toxisch als das Procain war, so muß in diesem Falle entweder die Resorptionsgeschwindigkeit bedeutend verlangsamt oder die Entgiftungsgeschwindigkeit bedeutend beschleunigt sein. Untersuchungen an 77 Kaninchen haben ergeben, daß das Hostacain sehr rasch aus dem Organismus entfernt wird und allein dadurch seine geringe Giftigkeit bei subcutaner Injektion erklärt werden kann.

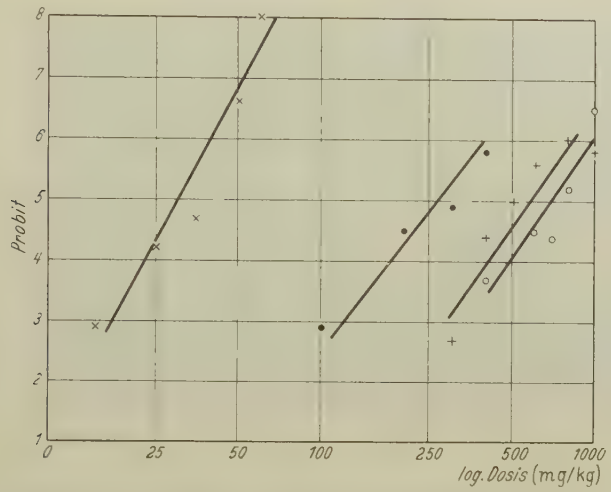


Abb. 8. Bestimmung der Toxicität an der weißen Maus nach subcutaner Injektion. Pantocain × × ×, Lidocain •••, Hostacain ○○○, Procain +++.

Als Maßstab für die Entgiftungsgeschwindigkeit haben wir, um unabhängig von der unkontrollierbaren Resorption subcutaner Depots zu sein, am Kaninchen die *intravenöse Dauerinfusion* gewählt. Für das Pantocain hat bereits Schaumann in seiner grundlegenden Arbeit eine Entgiftungsfähigkeit des Organismus mit 0,15 mg/kg und Minute festgestellt. Diese Dosis wird von den Tieren stundenlang ohne bleibende Schädigung vertragen. Höhere Dosen, bereits 0,2 mg/kg und Minute, führen zum Tod. Nach den Untersuchungen von Harnisch liegt die Lidocain-Dosis, bei welcher die Tiere zugrunde gehen, bei 1 mg/kg und Minute. Vom Novocain werden nach Schaumann größere Dosen vertragen. Die tödliche Novocain-Grenzdosis wurde von Schaumann mit 3 mg/kg und Minute angegeben; 2 mg/kg und Minute werden vertragen. In diesen und anderen uns zugänglichen Arbeiten haben wir bei den Untersuchungen über Entgiftungsgeschwindigkeit eine statistische Auswertung der Versuchsergebnisse vermißt.

Da wir bei unseren Untersuchungen über die Entgiftung von Hostacain kein einheitliches Tiermaterial, sondern Kaninchen verschiedenen Geschlechts von 2—3,5 kg verwendeten, mußten wir, zur Ausschaltung von Streuungen, die durch die Tiervariationen bedingt sind, wiederum die bewährte „*Alles oder Nichts*"-*Methode* anwenden. Nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß Hostacain gut entgiftet wird, haben wir eine Gesamt-

dosis von 200 mg/kg als *Grenzdosis* festgelegt; in der Minute wurde 1 cm^3 injiziert. Mit der Steigerung der pro Minute injizierten Konzentration des Lokalanaesthetikums (0,5 mg/kg bis 12 mg/kg) nahm die Anzahl der Versuchstiere, die bereits unterhalb dieser Grenzdosis von 200 mg starben, zu. Dabei wurden diejenigen Versuche als „positiv" gewertet, bei denen die Tiere bereits unterhalb der Dosis von 200 mg/kg während der Infusion zugrunde gingen. Aus der Gesamtzahl der Versuchstiere und den „positiv" reagierenden Tieren lassen sich Prozentzahlen ermitteln. Werden Probit-Werte dieser Prozentzahlen als Ordinate, der log-Dosis der pro Minute injizierten Menge als Abscisse in ein Koordinatensystem eingetragen, so erhält man Dosenwirkungskurven. Zum Vergleich wurde am gleichen Tiermaterial auch das Lidocain untersucht. Abb. 9 läßt erkennen, *daß Hostacain etwa 5mal rascher entgiftet wird als das Lidocain.*

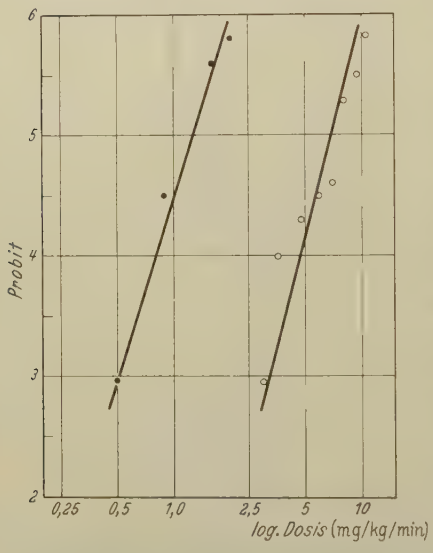


Abb. 9.
Bestimmung der Entgiftungsgeschwindigkeit von Hostacain ○○○ und Lidocain ••• durch intravenöse Dauerinfusion am Kaninchen. Abszisse: log Dosis der pro Minute injizierten Menge (mg/kg); Ordinate: Prozentsatz der Tiere, die unterhalb einer Grenzdosis von 200 mg/kg getötet wurden. (Probit-Werte.)

Das *Vergiftungsbild* bei Verabfolgung extrem hoher Dosen gleicht bei allen untersuchten Tierarten (s. Abschnitt IV) dem bekannten Vergiftungsbild der Lokalanaesthetica. Es kommt je nach der Dosis zu Lähmungserscheinungen und Krämpfen. Die Krämpfe treten allerdings nicht so sehr in Erscheinung wie wir sie nach der Injektion von Lidocain, Procain und Pantocain beobachten können. Auffallend ist, daß die Tiere sich sehr rasch erholen. Bei tödlichen Dosen wird das Atemzentrum gelähmt.

Um das Verhalten des *Blutdruckes* bei der Hostacain-Vergiftung (Abb. 10) zu studieren, erhielten Kaninchen (in Pernokton-Narkose) verschiedene Dosen intravenös injiziert. 3 mg/kg i. v. führten noch zu keiner wesentlichen Veränderung des Blutdruckes. 9 mg/kg führten zu einem Blutdruckabsturz, der jedoch nur kurze Zeit anhält. Den gleichen Blutdruckabfall rief bereits eine Menge von 3 mg/kg Pantocain hervor. Die Wirkung des Pantocain auf den Blutdruck ist aber vor allem dadurch gekennzeichnet, daß die Erholung hier wesentlich weniger rasch erfolgt.

Am *isolierten Meerschweinchenvorhofpräparat* wirkt das Hostacain noch in einer Verdünnung 1:200000 (in Herz-Ringer) negativ chronotop und negativ inotrop. Es erfolgt jedoch auch bei höheren Dosen keine bleibende Herzschädigung; wird

das Hostacain entfernt, so erholt sich das Präparat spontan. Versuche an Kaninchen, die pro Kilogramm 2 cm³ einer 2%igen Lösung subcutan erhielten, ließen keine Änderung des *Blutzuckerspiegels* erkennen. Eine am Kaninchen durch Pyrogenwasser hervorgerufene *Temperatursteigerung* ließ sich auch durch größere Dosen 80 mg/kg s. c.) nicht beeinflussen.

Lokal in das intracutane Zellgewebe des Kaninchenohres appliziert, führt das Präparat zu einer geringen Rötung der Injektionsstelle ohne Schwellung. Die Kaninchen-Cornea wurde durch Einträufeln einer 2%igen Lösung nicht geschädigt, die Bindehaut des Auges nicht gereizt.

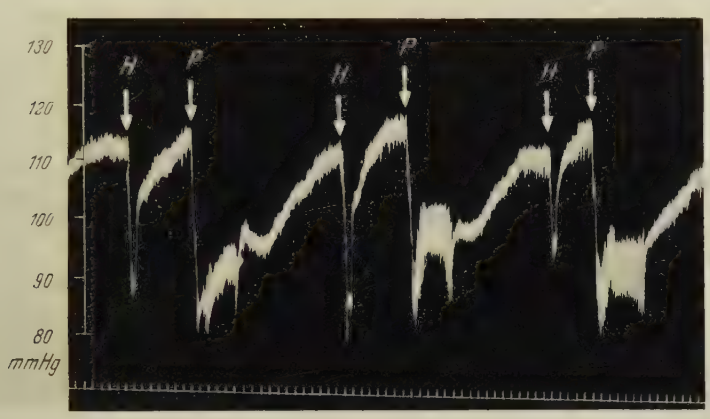


Abb. 10. Kaninchen (2,7 kg) in Pernokton-Narkose; Hg-Blutdruckmessung. Wirkung von Hostacain (*H*) 9 mg/kg i. v. und Pantocain (*P*) 3 mg/kg i. v. Zeit: Minuten.

Da in der letzten Zeit häufig die *bakteriostatische Wirkung* als besonderer Vorteil einiger Lokalanaesthetica hingestellt wurde, haben wir das Hostacainhydrochlorid auch in dieser Hinsicht geprüft. Die Versuche wurden im chemotherapeutischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst von Dr. Rolly durchgeführt. Als Test diente Staphylokokkus aureus 209 P, dessen Atmung in der Warburg-Apparatur vor und nach Zugabe einiger Lokalanaesthetica gemessen wurde. Sowohl bei der Ruhe-Atmung in 1%igem Natriumlactat als auch in der Wachstumsphase ließ das Hostacain ein deutliches Absinken der Atmung erkennen, wenn zu 2,5 cm³ Bakterienkultur im Warburg-Trog 0,5 cm³ der 2%igen Lösung hinzugefügt wurden. *Novocain und sein p-Aminosalicylsäurederivat zeigten in gleicher Konzentration keine Wirkung.* Bemerkenswert ist, daß die bakteriostatische Wirkung des Hostacain in Serumbouillon stärker als in gewöhnlicher Bouillon in Erscheinung trat.

III. Entgiftungsmechanismus.

Auf Grund der chemischen Konstitution des Hostacain war anzunehmen, daß die *Ausscheidung* durch den Harn erfolgt. Harnanalysen (Häussler u. Ther)[1] ergaben, daß die applizierte Substanz nicht wesentlich als solche ausgeschieden wird. Hostacainhydrochlorid gibt mit wäßriger Salpetersäure-Lösung (1:1) ein in Alkohol unlösliches

[1] Die ersten Untersuchungen wurden im analytischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst von Dr. Bürger durchgeführt.

Nitrat, dessen charakteristische Kristalle zum qualitativen Nachweis für Hostacain geeignet sind. Während das ganze Molekül nicht nachgewiesen werden konnte, ließ sich im Harn einiger Versuchstiere, die große Mengen (s. Abschn. IV) appliziert bekamen, bereits durch den Geruch die Anwesenheit eines aromatischen Spaltproduktes nachweisen. In einigen Harnen konnte durch Ausschütteln mit Äther o-Chlortoluidin als Nitrat nachgewiesen werden. Dieses unterscheidet sich vom Hostacain-Nitrat durch folgende Eigenschaft: Beim Erwärmen mit Salpetersäure auf 100—120° zersetzt es sich unter Verfärbung.

Weitere Beobachtungen des Harnes von Versuchstieren (Ratten und Kaninchen), die größere Mengen Hostacain erhalten hatten, ergaben, daß sich beim Stehen nach einigen Tagen durch bakterielle Einwirkung ein braunroter Farbstoff im Gegensatz zum Harn der Kontrolltiere, bildet. Wird dieser verfärbte Versuchsharn mit Natronlauge gekocht und dann mit Äther ausgeschüttelt, so erscheint in der ätherischen Schicht ein violett-roter Farbstoff mit stark rosa-roter Fluorescenz. Eine weitere Farbreaktion des Versuchsharns wurde beobachtet, wenn man diesen mit HCl kocht und einige Tropfen H_2O_2 hinzufügt. Es entsteht eine dunkelbraune Verfärbung des Harnes, wobei gleichzeitig ein stark aromatischer kresolähnlicher Geruch auftritt. Durch Ätherreaktion in saurem Medium kann eine dunkelbraune sirupartige Masse isoliert werden, die im Kontrollharn nicht nachgewiesen werden kann.

Nachdem wir durch Nachweismethoden festgestellt hatten, daß der aromatische Teil von Hostacain durch den Harn ausgeschieden wird, mußte dieser, wenn er als aromatisches Amin vorliegt, auch diazotierbar und kupplungsfähig sein. Die daraufhin angesetzten Versuche ergaben z. B. folgendes: 1 cm^3 Harn eines Kaninchens, das Hostacain (25 cm^3/kg einer 2%igen Lösung) innerhalb eines Zeitraumes von $1^1/_2$ Std subcutan erhalten hatte, wurde mit 5 Tropfen konzentrierter HCl gekocht, abgekühlt und in Eiswasser gestellt. Nach der Abkühlung auf ca. 0° wurde der Harn mit 1 Tropfen n-Natriumnitritlösung versetzt und das diazotierte Produkt in eine stark sodaalkalische R-Salzlösung gegossen. Es erfolgte augenblicklich die Bildung eines *roten Azofarbstoffes*. Versuche mit Kontrollharn verliefen negativ, auch Versuche mit Hostacainhydrochlorid. Dagegen ergab eine wäßrige Lösung von Orthochlortoluidin die gleiche Farbreaktion.

Nachdem die Harnanalyse den Nachweis erbracht hatte, daß Hostacain im Organismus gespalten wird, führten wir, um den Mechanismus der Spaltung kennenzulernen, Versuche *in vitro* mit verschiedenen Geweben durch. Dabei ergab sich, daß Hostacain durch *Leberbrei* in weit stärkerem Maße gespalten wird als durch Nierengewebe, Blut und Muskelbrei. Den Nachweis haben wir mit Hilfe folgender Methoden geführt:

1. Biologisch durch Messung der Abnahme der lokalanaesthetischen Wirkung einer Hostacain-Lösung, die bei Zimmertemperatur mit wäßrigem Leberbreiextrakt (Herstellung siehe unten) inkubiert wurde. Zu

diesen Versuchen wurden 9 Teile wäßriger Leberextrakt mit 1 Teil einer 2%igen Lösung des Lokalanaesthetikums versetzt. Die infiltrationsanaesthetische Wirkung des Gemisches wurde an der Meerschweinchenquaddel (siehe oben) nach bestimmten Inkubationszeiten von 5 und

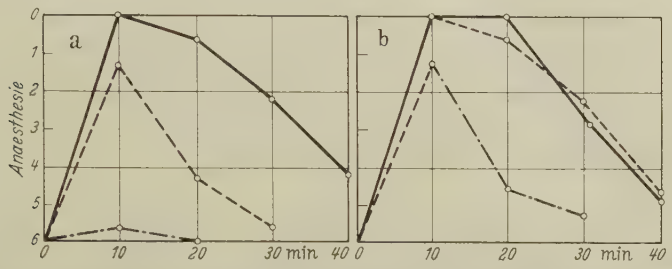


Abb. 11. Wirkung von Hostacain (*a*) und Lidocain (*b*) an der Meerschweinchenquaddel. Konzentration der Lösungen 0,2%. Kontrollversuche (ohne Leberextrakt) o——o; Versuche mit Leberextrakt: Inkubationszeit (5 min) o- - -o; Inkubationszeit (60 min) o- · - · -o.

60 min gemessen. In Abb. 11 sind die Versuche mit Hostacain (*a*) und Lidocain (*b*) wiedergegeben.

2. Chemisch durch Bestimmung der bei der Spaltung freiwerdenden Säure. Die Titration erfolgt nach der Methode von Willstätter und Waldschmidt-Leitz. 50 g Leberbrei wurden mit 150 cm³ m/15 Phosphatpufferlösung (p_H 7,3) versetzt und 20 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wurde dekantiert und zu je 12 cm³ der abgegossenen Flüssigkeit 8 cm³ einer 2%igen Lösung des Lokalanaesthetikum zugegeben. Nach verschieden lang anhaltenden Inkubationszeiten bei 37° (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) wurde die Fermentreaktion durch Zugießen von 20 cm³ 96%igen Alkohols unterbrochen. Die Titration erfolgte mit einer m/15 KOH-Lösung und Thymolphthalein als Indicator. Aus der folgenden Abb. 12 ist die wesentlich größere Spaltungsgeschwindigkeit des Hostacain im Vergleich zu Lidocain ersichtlich. Der Ausgangswert (bei 1 min) wurde mit 100% angesetzt.

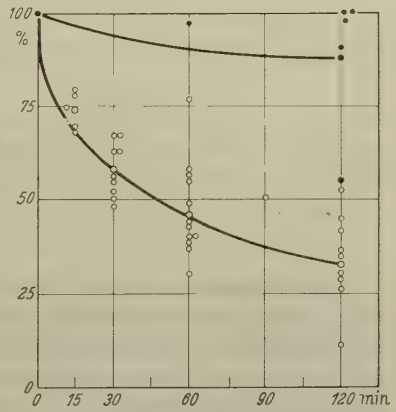


Abb. 12. Wirkung von Leberbrei auf die Lokalanaesthetica Hostacain o o o und Lidocain • • •. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Spaltung.

Diese beiden Untersuchungen zeigen, daß Hostacain durch ein *Ferment der Leber* bei einem p_H von 7,3 gespalten wird.

IV. Untersuchungen über die Wirkung der Hostacain-Spaltprodukte.

Nachdem auf Grund von Versuchen in vitro feststand, daß das Präparat in der Leber durch Fermente gespalten wird, galt es den Nachweis zu bringen, daß auch die Spaltprodukte, vor allem der aromatische Teil, nicht toxisch wirken. Von ganz besonderer Bedeutung müssen daher die Versuche sein, die an Hunden, Katzen, Kaninchen und Ratten gezeigt haben, daß auch nach vielfach wiederholten Injektionen in den Organen der Versuchstiere keine Schädigungen festzustellen waren. Die Dosierungen, die von uns angewendet wurden, sind in der beiliegenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 1. *Chronische Toxizitätsversuche mit Hostacain.*

Tiergattung	Anzahl der Tiere	Einzeldosis in mg/kg	Anzahl der Injektionen	Versuchsdauer in Tagen	Gesamtmenge in g/kg	Gesamtmenge in g/Tier
Hund	1	40	25	33	1,0	12,9
	1	30	25	33	0,75	8,25
	1	20	25	33	0,5	6,45
Kaninchen	1	80	18	25	1,44	3,6
	4	60	17	24	1,02	2,6; 2,3; 2,5; 1,5
	3	40	25	33	1,00	2,50; 2,70; 2,7
	1	30	25	33	0,75	1,87
	2	20	25	33	0,50	1,35; 1,10
						Durchschnitt
Ratten	3	80	18	25	1,44	0,202
	3	40	25	33	1,0	0,156
	3	30	25	33	0,75	0,147
	3	20	25	33	0,5	0,09
Katzen	1	60	18	25	1,0	2,1
	1	40	26	33	1,04	2,2
	1	20	26	33	0,52	1,04

Die Tiere erhielten die Injektion täglich (außer sonn- und feiertags). Nach Abschluß der Versuche wurde eine Beobachtungszeit von 4 Wochen eingeschaltet und anschließend die Sektion[1] durchgeführt. Die makroskopischen und histologischen Untersuchungen ergaben keine Anhaltspunkte für eine Schädigung, vor allem der Stoffwechsel- und Ausscheidungsorgane (Blase). Um die Ungiftigkeit des Hostacain und seiner Spaltprodukte zu demonstrieren, haben wir außerdem Versuche an einigen Tieren mit *extrem hohen Dosen* durchgeführt. So erhielt beispielsweise ein 11 kg schwerer Hund am 11. 11. 1952 im Verlaufe von 8 Std

[1] Die Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Benoit makroskopisch und histologisch durchgeführt. Für seine Mühe möchte ich ihm an dieser Stelle ganz besonders danken.

4 g Hostacain s. c. injiziert. Das Tier erhielt insgesamt 100 cm³ einer 4%igen Lösung, die in 5 Portionen injiziert wurde. Diese toxischen Dosen führten zu Seitenlage mit Laufbewegungen, Beeinflussung der Atmung und Speichelfluß. Das Tier erholte sich sehr rasch und überlebte die Wiederholung dieser Dosis am 10. 1., 16. 1., 19. 1. und 22. 1. 1953. Der Hund erhielt innerhalb eines Zeitraumes von etwa 2 Monaten insgesamt etwa 20 g Hostacain einverleibt. Außer an den Tagen, an denen er das Hostacain verabreicht bekam, war er munter, freß- und rauflustig und behielt sein Gewicht. 14 Tage nach der letzten Injektion wurde das Tier getötet. Die Sektion ergab keine Anhaltspunkte für eine Schädigung der Organe. Auch Versuche an Kaninchen, die innerhalb eines Zeitraumes von 12 Tagen 2, 4, 6 und 8 g Hostacain s. c. als 2%ige Lösung erhielten, zeigten keine Schädigung bei der Sektion, die 14 Tage nach der letzten Injektion durchgeführt wurde. Bei Anwendung derartig extrem hoher Dosen wurde beobachtet, daß im Harn der Kaninchen bereits durch den Geruch o-Chlortoluidin zu erkennen war.

Zusammenfassung.

Das *Hostacain* (Hydrochlorid des ω-n-Butylamino-essigsäure-2-methyl-6-chloranilid) ist ein Leitungsanaesthetikum der Nirvanin-Reihe, dessen „Peptid"-ähnliche — NHCO — Bindung im Organismus *durch Fermente* gespalten wird. Versuche in vitro ergaben, daß die Spaltung vor allem in der Leber erfolgt und daher eine durch Hostacain am Applikationsort hervorgerufene lokale Anaesthesie vollkommen unbeeinflußt bleibt.

Am Froschischiadicus und im Mäuseschwanztest erwies sich das Hostacain als stark wirksames Leitungsanaesthetikum, das die Wirkung des Procain etwa um das 4fache übertrifft. Die Anaesthesie tritt äußerst rasch ein und hält, wie Versuche an der Meerschweinchenquaddel ergaben, viel länger an als bei Anwendung gleichkonzentrierter Procain-Lösungen.

Die rasche Spaltung der resorbierten Hostacain-Mengen bietet den Vorteil, daß bei langsamer Resorption im Organismus nicht die Konzentration erreicht wird, die zu einer allgemeinen Vergiftung führt. Trotz seiner starken lokalanaesthetischen Wirkung ist das Hostacain *bei s. c. Injektion*, die eine langsame Resorption gewährleistet, nur ebenso *toxisch wie das Procain*. Daß diese geringe Toxizität auf einer raschen Spaltung des Hostacain im Organismus und nicht auf einer lokalen Resorptionsverzögerung bei subcutaner Injektion beruht, bewiesen Versuche an Kaninchen, denen das Präparat intravenös als Dauerinfusion einverleibt wurde. Bei rascher intravenöser Injektion ist Hostacain entsprechend seiner starken Wirkung doppelt so toxisch wie das Procain.

Die Spaltprodukte des Hostacain werden mit dem Harn ausgeschieden. Auch bei wiederholter Verabfolgung konnte an den Versuchstieren keine Schädigung der Organe beobachtet werden.

Literatur.

Einhorn u. Oppenheimer: Liebigs Ann. **311**, 155 (1900). — Fromherz, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **93**, 75 (1922). — Fussgänger, R., u. O. Schaumann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **160**, 53 (1931). — Harnisch, H.: Dtsch. zahnärztl. Z. **7**, 380 (1952). — Häussler, A. und L. Ther: Ärztl. Forsch. (im Druck). — Löfgren, N.: „Studies on Local Anaesthetics", Diss. Stockholm 1948. — Mc Mahon u. Woods: zit. nach Sten Wiedling: Anaesthesist **1**, 119 (1952).

Privatdozent Dr. med. Leopold Ther, Pharmakol. Laboratorium der Farbwerke Hoechst, Frankfurt a. Main.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 317—320 (1953).

Aus dem Institut für animalische Physiologie der Universität Frankfurt/Main
(Direktor: Prof. Dr. K. Wezler).

Plastischer Tonus der Magenring-Muskulatur und Theophyllin-Effekt.

Von
Aloysius Krieg.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Mai 1953.)

Einleitung.

Im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur mit ihren vorwiegend *elastischen* Eigenschaften besteht beim glatten Muskel keine feste Relation zwischen Spannung und Länge des Systems. Dies hat seine Ursache in den hinzukommenden *plastischen* Eigenschaften der glatten Muskulatur, die unter anderem die sogenannten Nachwirkungserscheinungen (z. B. Relaxation bei isometrischer, Nachdehnung bei isotonischer Belastung) hervorrufen. Sie bedingen unter anderem auch die Unmöglichkeit der Reproduktion von Versuchen am gleichen Objekt. Diese Verhältnisse sind von besonderer Bedeutung für die Physiologie der Hohlorgane, die sich aus glatten Fasern aufbauen, so gibt z. B. der volle und mi hin gedehnte Magen der Last mehr nach als der leere (Jordan). Ein mechanisches Modell für die *isotonische Zeit-Dehnungskurve* eines glatten Muskels (Retractor penis) hat Winton gegeben.

Im folgenden ist die bereits von Greven eingehend untersuchte Dehnungskurve der Magenring-Muskulatur vom Frosch nochmals einer Betrachtung unterzogen und der Einfluß von Oxyäthyl-Theophyllin auf diese untersucht worden. Anlaß hierzu gaben die Befunde von Neuroth, Wezler und Sieglitz, wonach Purinkörper den Verlauf der Kurve der isotonischen Minima im Druckvolumdiagramm des spontan schlagenden Froschherzens verändern, speziell, daß Oxyäthyl-Theophyllin (Cordalin) die Anfangsfüllung des Herzens bei gleichem Druck erhöht, also die genannte Kurve nach rechts verschiebt.

Methodik.

Die in Frosch-Tyrodelösung gebadeten Muskelringe aus dem mittleren Teil des Magens von Winter-Temporarien wurden in einer feuchten Kammer aufgehängt und mit einem isotonischen Hebel verbunden. Die Aufhängevorrichtung trug gleichzeitig die Reizelektroden. Nach halbstündiger Vorbelastung mit 1,7 g zur Kopplung mit dem Schreibhebel wurde zum Dehnungsversuch zusätzlich mit 6 g belastet.

Nach erfolgter Dehnung (5 min) wurde entlastet und durch elektrische Reizung mit Wechselspannungen (50 Hz) von 2—6 V die mechanische Ausgangslänge wieder hergestellt (Greven, 1950).

Das Theophyllinderivat (Cordalin) wurde in Verdünnungen mit Frosch-Tyrode durch Auftropfen an das Präparat gebracht.

Neben der qualitativen Beurteilung der Dehnungskurve kann eine einfache quantitative Auswertung derart erfolgen, daß man nach einer bestimmten Zeit (z. B. 80 sec) auf dem Kurvenblatt eine Ordinate aufträgt und die Ordinatenwerte der Kurven-Schnittpunkte bestimmt.

A. Dehnung der Magen-Muskulatur.

Greven konnte an der glatten Muskulatur des Froschmagens zeigen, daß Belastungskurven (isotonische Zeit-Dehnungskurven) bei Wiederholungen ceteris paribus miteinander identisch sind; d. h., daß der plastische Tonus gleichbleibt. Hiervon macht lediglich die 1. Dehnungskurve des Präparates eine Ausnahme, welche stets über der Kurvenschar der übrigen Wiederholungsdehnungen liegt. Zwischen der 1. und 2. Dehnung nimmt also der plastische Tonus des Präparates stark ab. Dies ist wohl der Befund in der Mehrzahl aller Versuchsanordnungen. Jedoch ist im Einzelfall das Versuchsergebnis sehr abhängig von der Belastungsgröße, dem ursprünglichen Tonusspiegel und anderen Einflüssen.

In 13 eigenen Versuchen zeigte sich nun unter günstigen Umständen (in 3 Fällen), daß auch eine oder mehrere Kurven zwischen der 1. Dehnungskurve und der Schar der identischen Wiederholungskurven liegen können. Bei quantitativer Auswertung der in Abb. 1 wiedergegebenen Verhältnisse z. B. hat die Kurve 1 den Ordinatenwert — 1,7, die Kurve 2 den Wert — 3,1 und die Kurve 3 den Wert — 3,5. Die folgenden Wiederholungskurven 4—6 besitzen aber einen noch niedrigeren Wert und lassen sich etwa durch eine Idealkurve mit dem Ordinatenwert — 3,7 ersetzen. Dieser Sachverhalt war zu erwarten, da die Abnahme des plastischen Tonus sicher nicht sprunghaft bei der 1. Dehnung abnimmt, sondern wahrscheinlich einer logarithmischen Funktion gehorcht.

Die von Greven abgebildete Kurvenschar demonstriert hiernach den Grenzfall, bei welchem der Tonusabfall zu dem angenommenen Endbereich so rasch erfolgt, daß bereits die 2. Kurve den tiefen Ordinatenwerten sehr nahe kommt.

Der von Winton angenommene lineare Abfall war nicht zu beobachten; die Wiederholungskurven bei Dehnungen (ohne Einwirkung von Pharmaka) divergierten nie auffallend, sondern bildeten eine eng zusammenliegende Schar, wie das auch Greven beschrieb.

B. Wirkung des Oxyäthyl-Theophyllins auf den plastischen Tonus.

Zur Prüfung des Einflusses von Pharmaka auf den Tonus der glatten Muskulatur stellt man zweckmäßigerweise durch wiederholte Belastungen zunächst den oben erwähnten Endbereich ein. Nach Applikation des zu untersuchenden Stoffes versucht man durch eine Anzahl weiterer Belastungen den neuen Zustand zu charakterisieren.

An Versuchen, den plastischen Tonus zu beeinflussen, hat es nicht gefehlt; s. a. JORDAN. GREVEN versuchte, in Analogie zur Möglichkeit der Beeinflussung des „kontraktilen" Tonus durch Nervenreizung oder Behandlung mit Mimetica des vegetativen Systems den plastischen Tonusabfall nach Dehnungen wieder rückgängig zu machen; allerdings vergebens. Hingegen konnte er durch mäßige Wärme-Behandlung oder Steigerung des osmotischen Druckes (nicht hingegen durch p_H-Änderung) diese „normale" *innere Erweichung* der Muskelsubstanz wieder zum Verschwinden bringen. Dieser mögliche Vorgang war jedoch an eine vorausgegangene Kontraktion gebunden; bei mangelnder kontraktiler Tätigkeit erfolgte keine *innere Verfestigung* der Muskelsubstanz mehr.

Abb. 1. Theophyllin-Effekt am „ruhigen" Magenring (R. temp.). *1, 2, 3, 4, 5, 6* normale Dehnungskurven; *I, II, III, IV* Dehnungskurven nach Theophyllin (10^{-4}). — 1 cm = 20 sec.

Abb. 2. Theophyllin-Effekt am autonom arbeitenden Magenring. *1, 2, 3* normale Dehnungskurven; *I, II, III, IV* Dehnungskurven nach Theophyllin (10^{-4}). — 1 cm = 20 sec.

Gerade in entgegengesetzter Richtung liegen die Ergebnisse mit substituiertem *Theophyllin*. Bei 10 mit *Cordalin* (*Oxyäthyltheophyllin*) angestellten Versuchen konnte ein deutlicher Einfluß des Pharmakons in Konzentrationen $> 10^{-5}$ auf die Dehnungskurven beobachtet werden. Die Wirkung besteht darin, daß der plastische Tonus stark absinkt, so daß man von einem „*Weichmacher-Effekt*" im Sinne von WEBER sprechen kann. Dies geht sehr deutlich aus dem Verhalten des in Abb. 1 wiedergegebenen Präparates hervor. Gegenüber der Schar der normalen Wiederholungskurven mit einem Ordinatenwert von — 3,7 erfolgte nach Oxyäthyl-Theophyllingabe (10^{-4}) eine Verminderung der Werte auf — 4,4. Diese Wirkung ist praktisch nicht auswaschbar, so daß mit einem Einbau des Purinkörpers in die Muskelsubstanz zu rechnen ist. Unter Umständen

erfolgt die Annahme des Theophyllinderivates durch das Präparat langsam und verzögert, so daß sich nicht gleich ein stationärer Tonusspiegel einstellt. Wir erhalten dann zunächst ein Bild, wie es die Abb. 2 als Extrem zeigt: ein zunehmendes Absinken der Folge-Dehnungskurven. Aber auch hier stellt sich nach entsprechender Wartezeit ein relativ fester Tonusgrad ein. In jedem Falle, ob wir ein „ruhiges" (Abb. 1) oder autonom arbeitendes (Abb. 2) Präparat vor uns haben, zeigt das Oxyäthyl-Theophyllin gegenüber dem plastischen Tonus stets den gleichen Effekt, was in dem Abfall der Dehnungskurven zum Ausdruck kommt.

Was die Vermutung über den möglichen Angriffspunkt des Theophyllins in der Feinstruktur der Muskulatur betrifft, so ergeben sich hierfür einige Anhaltspunkte aus den Untersuchungen von Weber an seinem sich fast *plastisch* verhaltenden Actinomyosin-Modell des Muskels. Er konnte nachweisen, daß die Adenosintriphosphorsäure (ATP) nicht nur als Energielieferant sondern auch als „Weichmacher" auf die Muskulatur wirkt: kommt es zu einer Erschöpfung des ATP-Bestandes, so wird der Muskel starr (z. B. bei Monojodessigsäure-Vergiftung, Totenstarre). Der für ATP und Theophyllin gemeinsame „Weichmacher-Effekt" scheint daher seinen Grund in der Tatsache zu haben, daß es sich in beiden Fällen um Purinderivate handelt. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch das Theophyllin über eine Polyphosphatkette Einfluß auf die durch Salyrgan blockierbaren SH-Gruppen des Actinomyosins gewinnt und auf diese Weise den beobachteten „Weichmacher-Effekt" erzielt.

Zusammenfassung.

Die Nachdehnung des Frosch-Magenringes geht mit einer Senkung des Tonus konform, welche stetiger Natur ist und einem von den Versuchsbedingungen abhängigen Endbereich zustrebt. Durch Einwirkung von Oxyäthyl-Theophyllin sinkt der Tonus weiter ab. Diese Wirkung auf den plastischen Tonus der glatten Muskulatur läßt sich als Weichmacher-Effekt im Sinne Webers umschreiben, ist also grundsätzlich die gleiche, wie die von Neuroth und Wezler am Froschherzen gefundene.

Literatur.

Greven, K.: Z. Biol. **103**, 302, 321 (1950); **104**, 100, 374 (1951). — Jordan, H. J.: Erg. Physiol. **40**, 437 (1938). — Neuroth, G., K. Wezler u. G. Sieglitz: Diese Z. (im Druck). — Weber, H. H.: Z. Elektrochem. usw. **55**, 511 (1951). — Winton, F. R.: J. of Physiol. **69**, 393 (1930).

Dr. Aloysius Krieg, Göttingen, Nikolausbergerweg 51.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 321—333 (1953).

Aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin (Direktor: Professor Dr. Dr. E. Freerksen).

Enzymatische Inaktivierung von Isonicotinsäurehydrazid im menschlichen und tierischen Organismus.

Von

Rudolf Bönicke und Waltraud Reif.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Mai 1953.)

Von den zur Zeit in der Klinik verwendeten Tuberkulostatika wie Conteben, p-Aminosalicylsäure, Streptomycin und Isonicotinsäurehydrazid besitzt letzteres die weitaus größte tuberkulostatische Wirksamkeit in vitro. Ob aber diese hohe, in vitro ermittelte Aktivität auch in vivo voll zur Wirkung kommen kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab, von denen im folgenden die für die therapeutische Eignung so wesentliche Eigenschaft der Stabilität gegenüber den Enzymen des Makroorganismus behandelt werden soll.

Ein erster Hinweis über das Schicksal eines Therapeutikums im Makroorganismus kann aus Versuchen über seine Wiederausscheidung durch die Niere gewonnen werden. Die darüber bisher für das INH vorliegenden Mitteilungen, in denen die Wiederausscheidung übereinstimmend mit 50—75% der applizierten Dosis angegeben wird, könnten zu der Auffassung verleiten, daß das applizierte INH im menschlichen Organismus keine nennenswerte Wirkungseinbuße infolge enzymatischen Ab- oder Umbaues erfährt. Das ist aber nach unseren Untersuchungen keineswegs der Fall. Das INH wird im menschlichen Organismus zu einem beträchtlichen Teil zu unwirksamen Verbindungen um- oder abgebaut. Wenn die Inaktivierung des INH bisher nicht erkannt wurde, so lag das wohl im wesentlichen an der Unzulänglichkeit der verwendeten INH-Bestimmungsmethoden. Die zumeist verwendete chemische Methode nach Kelly und Poet besitzt nicht die für solche Untersuchungen erforderliche Spezifität. Mit ihr wird nicht nur freies, tuberkulostatisch wirksames INH erfaßt, sondern auch sämtliche an der NH_2-Gruppe gebundenen, durch Kochen im sauren Milieu hydrolysierbaren, tuberkulostatisch unwirksamen Umwandlungsprodukte. Wir haben schon in früheren Publikationen (Bönicke [1—3]) darauf hingewiesen, daß bei Verwendung mikrobiologischer oder spezifischerer chemischer INH-Bestimmungsmethoden, mit denen nur tuberkulostatisch wirksames INH meßbar ist, die hohen Wiederausscheidungswerte von 50—75%

nicht reproduzierbar sind. Wir erhielten mit diesen INH-Nachweismethoden erheblich geringere Ausscheidungswerte. In Fortsetzung dieser Arbeiten waren wir bestrebt, die Untersuchungen über die Wiederausscheidung des INH, seiner Abbau- und Umwandlungsprodukte unter Verwendung möglichst verschiedenartiger Nachweismethoden in qualitativer und quantitativer Hinsicht zu ergänzen.

Methodischer Teil.

1. Mikrobiologische INH-Bestimmung.

Zwei mikrobiologische INH-Bestimmungsmethoden wurden von uns verwendet, der Lochtest und der Reihenverdünnungstest. Der Lochtest besitzt gegenüber dem Reihenverdünnungstest den Vorteil der größeren Genauigkeit und der schnelleren Ablesbarkeit des Meßergebnisses. Sein Nachteil ist die geringere Empfindlichkeit. Die Nachweisgrenze liegt bei 2,5 γ/ml, während im Verdünnungstest noch 0,1—0,2 γ/ml meßbar sind. Die relativ geringen INH-Konzentrationen im Blutplasma haben wir daher mit Hilfe des Verdünnungstestes bestimmt. Der INH-Nachweis im Urin erfolgte im Lochtest, dessen technische Durchführung von uns an anderer Stelle (Bönicke [1]) ausführlich beschrieben worden ist.

Die Bestimmung der INH-Konzentration im Blutserum wurde mit Hilfe des Verdünnungstestes wie folgt durchgeführt: Von dem auf seinen INH-Gehalt zu untersuchenden Serum wird mit sterilem, INH-freien Serum eine Verdünnungsreihe in fallenden 2er Potenzen hergestellt. Röhrchen 1 enthält 0,5 ml des zu untersuchenden Serums, Röhrchen 2 0,5 ml des zu untersuchenden Serums, dem 0,5 ml INH-freies Blutserum zugefügt wird. Nach guter Durchmischung werden davon 0,5 ml in ein drittes Röhrchen übertragen und 0,5 ml INH-freies Serum zugefügt, gut durchmischt und wiederum davon 0,5 ml in ein 4. Röhrchen gegeben usw. Das 12. Röhrchen (Kontrollröhrchen) enthält nur 0,5 ml INH-freies Serum. Alle Röhrchen der Reihe werden mit 4,5 ml synth. Nährlösung für Tuberkelbakterien nach Lockemann auf 5 ml aufgefüllt und mit einem Tropfen einer 15tägigen Dubos-Kultur von Mycobact. tuberculosis Typus humanus (Greifswald), 1:100 mit phys. NaCl verdünnt, beimpft. Nach 20tägiger Bebrütungszeit bei 37° C wird festgestellt, bis zu welchem Röhrchen der Reihe das Wachstum des Testbakteriums ausgeblieben ist. Durch Vergleich mit einer Kontrollreihe wird die INH-Konzentration des zu untersuchenden Serums ermittelt.

2. Chemische Methoden.

a) Methode nach Kelly und Poet.

Nach dieser Methode wird die Hydrazingruppe des INH hydrolytisch abgespalten und durch Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in einen gelben Farbstoff überführt, der im Photometer quantitativ bestimmbar ist. Da auch andere in Äther-Amylalkohol-Mischung lösliche Substanzen des Urins mit p-Dimethylaminobenzaldehyd ähnliche Färbungen ergeben, ist es notwendig, zu jeder Messung eine Leerbestimmung durchzuführen, die allerdings bei Patienten, die unter INH-Medikation

stehen, nur schwer möglich ist. Auch bei Versuchspersonen, die zur Prüfung der Wiederausscheidung des INH eine einmalige INH-Dosis erhalten, macht die Berücksichtigung dieses Tatbestandes Schwierigkeiten, da die Konzentration dieser färbenden Substanzen innerhalb von 24 Std starken Schwankungen unterliegt. Wir haben daher bei diesen Versuchspersonen unmittelbar vor Applikation des INH den Urin zur Leerwertbestimmung untersucht und glauben, dadurch die durch die färbenden Substanzen bedingte Ungenauigkeit gemindert zu haben.

Wie bereits einleitend ausgeführt, wird mit dieser Methode nicht nur freies, tuberkulostatisch wirksames INH erfaßt, sondern auch sämtliche an der NH_2-Gruppe substituierten Umwandlungsprodukte, die durch Kochen im sauren Milieu hydrolysierbar sind. Sie ist also keine spezifische INH-Bestimmungsmethode.

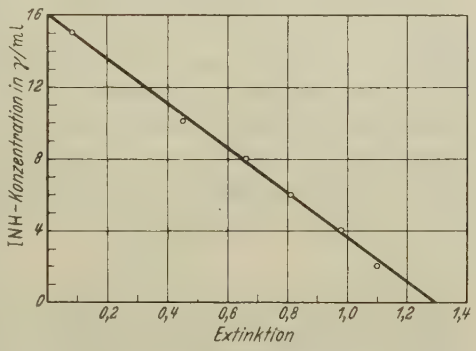


Abb. 1. Eichkurve zur Bestimmung von INH (Gesamt-INH) (Methode nach KELLY und POET).

Im einzelnen wurde der INH-Nachweis im Urin wie folgt durchgeführt: 3 ml Urin werden mit 3,2 g Ammonsulfat, 1 ml 0,5 n NaOH und 40 ml 20%iger Isoamylalkohol-Äther-Mischung versetzt und 10 min mechanisch geschüttelt. Im Scheidetrichter wird die organische Phase abgetrennt. 30 ml des Isoamylalkohol-Äther-Extraktes werden mit 4 ml 0,1 n HCl versetzt und 5 min geschüttelt. Von dem sauren Extrakt werden 3 ml in ein graduiertes Röhrchen übertragen, 0,5 ml 6 n HCl und 1 ml p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung zugefügt und gut gemischt. Zur vollständigen Hydrolyse wird 45 min auf 100 °C im Wasserbad erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 0,1 n HCl auf 4 ml aufgefüllt. Anschließend wird im Photometer (Zeiß-Filter S 42) die Extinktion gegen einen Blindwert gemessen. Der Blindwert setzt sich zusammen aus 3 ml n/10 HCl, 1 ml p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung und 0,5 ml 6 n HCl. Er wird wie oben beschrieben, erhitzt und auf 4 ml aufgefüllt. Die zu der gemessenen Extinktion gehörige INH-Konzentration ergibt sich aus der Eichkurve (Abb. 1), die nach der gleichen Methode aus wäßrigen INH-Lösungen bekannter Konzentration angelegt wird.

Der Nachweis im Serum erfolgt auf die gleiche Weise, jedoch mit einer halbstündigen Dauer des Ausschüttelns.

Reagenzien: a) 20%ige Lösung von Isoamylalkohol p. a. in Äther,
b) p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung.

1,2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 20 ml absol. Methanol gelöst und 2 ml 12 n HCl zugefügt.

b) Nachweis von freiem INH.

Die unter a) beschriebene Methode nach KELLY und POET wurde von uns so abgewandelt, daß nur das freie INH, nicht aber die Umwandlungsprodukte, erfaßt werden. Sie beruht auf der Reaktion der

freien NH_2-Gruppe des INH mit p-Dimethylaminobenzaldehyd unter Bildung eines gelben Farbstoffes, der photometrisch ausgewertet wird. Sie stellt also wegen des Verzichts auf die Hydrolyse eine Vereinfachung der Methode von Kelly und Poet dar, besitzt jedoch eine geringere Empfindlichkeit.

Nachweis im Urin. 6 ml Urin werden in einer 100 ml-Glasstöpselflasche nach Zugabe von 6,4 g Ammonsulfat und 2 ml 0,5 n NaOH mit 80 ml 20%iger Isoamylalkohol-Äther-Mischung 10 min mechanisch geschüttelt. 60 ml des organischen Extraktes werden in eine 100 ml-Glasstöpselflasche pipettiert und 5 min lang mit 4 ml 0,1 n HCl geschüttelt. 2 ml der salzsauren Lösung werden mit 1 ml Wasser, 1 ml 20%iger Trichloressigsäure und 1 ml Ehrlich-Reagens versetzt und nach einer halben Stunde photometriert (Zeiss-Filter S 42); gemessen wurde gegen den gleichbehandelten Leerurin als Blindwert. Die zu der gemessenen Extinktion gehörige INH-Konzentration ergibt sich aus der Eichkurve (Abb. 2), die nach der gleichen Methode aus INH-Lösungen (Lösungsmittel = Urin) bekannter Konzentration angelegt wird.

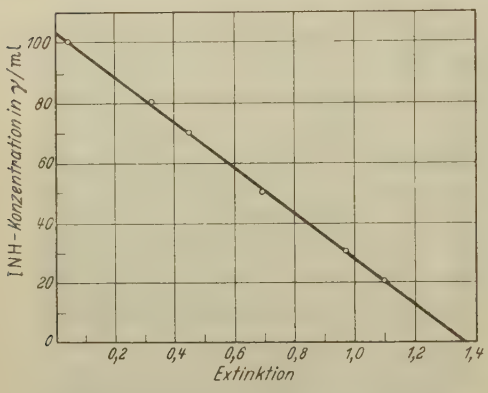


Abb. 2. Eichkurve zur Bestimmung von INH (freies INH) (unhydrolysierte Methode).

Der Nachweis im Serum erfolgt wie der im Urin (mit ½stündiger Dauer des Ausschüttelns).

Reagenzien. Ehrlich-Reagenz: 3 g p-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 100 ml Eisessig gelöst und 100 ml 54,4%ige 4 m Natriumacetat-Lösung zugefügt.

c) Nachweis von Isonicotinsäure.

Zum Nachweis der INS wird die bekannte Reaktion der Pyridinderivate mit Bromcyan und primären Aminen verwendet. Wir hielten uns im wesentlichen an das von Rubin, Drekter, Scheiner und de Ritter beschriebene Verfahren.

Nachweis im Urin. 2 ml Urin (oder verdünnter Urin) werden im graduierten Röhrchen mit 4 ml aqua dest. und 1,8 ml 4,5 n HCl versetzt. Nach Zugabe von 2,2 ml 4,5 n NaOH und Phenolphthalein als Indicator wird mit 2 n HCl bis zum Umschlag von Rot nach Farblos titriert und mit Ammonreagens auf 12 ml aufgefüllt. 5 ml dieser Mischung werden mit 1 ml 10%iger Bromcyanlösung versetzt und nach genau 4 min photometriert. An Stelle der Versuchslösung werden 2 ml aqua dest. nach dem gleichen Verfahren behandelt. Zum Vergleich wird INH-freier Urin, der derselben Versuchsperson unmittelbar vor Applikation des INH entnommen wird, nach dem gleichen Verfahren gemessen. Eichkurve Abb. 3.

Nachweis in der Leber. Frische Leber wird zu einem homogenen Brei zerkleinert, und zu 12 g werden 2,4 mg (bzw. 1,8 oder 1,2 mg) INH gegeben, gut vermischt und 2 Std im Brutschrank bei 37° C gehalten. Danach wird mit 48 ml physiologischer

NaCl 24 Std im Eisschrank eluiert. Der Auszug wird filtriert, mit Natriumwolframat-Schwefelsäure enteiweißt und die INS aus dem Filtrat nach obigem Verfahren bestimmt.

Reagenzien. Natriumwolframat-Schwefelsäure. 10%iges Natriumwolframat wird mit dem gleichen Volumen 2/3 n Schwefelsäure gemischt.

Gepuffertes Ammonreagens, s. unten.

d) Bestimmung von INH durch Umwandlung in INS.

Die Umwandlung von INH in INS erfolgt durch Kochen im sauren Milieu; anschließend wird oxydiert. In Abwandlung des Verfahrens nach Rubin, Drekter, Scheiner und de Ritter verwendeten wir nicht Kaliumpermanganat als Oxydationsmittel, sondern Cerisulfat, das uns wegen der Eindeutigkeit der Reduktion vom 4-wertigen zum 3-wertigen Cer geeigneter erschien. Die nach dieser Methode in Körperflüssigkeiten wie Urin, Blutserum oder Liquor ermittelten INS-Konzentrationen setzen sich zusammen aus Isonicotinsäure, die sich aus INH durch die Wirkung körpereigener Enzyme (Leber) bildet, sowie aus freiem INH und gebundenem INH, die durch das Nachweisverfahren in INS umgewandelt werden.

Quantitativer Nachweis im Urin:

2 ml Urin (oder je nach zu erwartender INH-Konzentration entsprechend verdünnter Urin) werden im graduierten Röhrchen mit 2 ml n/10 Schwefelsäure 20 min im siedenden Wasserbad erhitzt. In die heiße Lösung werden 0,5 ml 4 n Schwefelsäure und 0,8 ml 6 n HCl gegeben und von einer 15%igen Cerisulfat-Lösung in 0,5 n Schwefelsäure [$Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$] bis zur bleibenden Gelbfärbung zugetropft. Nach Reduktion des überschüssigen Cerisulfats mit 1%iger Ascorbinsäure-Lösung werden zur Neutralisation 2,2 ml 4,5 n NaOH zugefügt. Dabei entsteht je nach Menge des zugefügten Cerisulfats ein mehr oder weniger starker Niederschlag. Nach Zugabe von 1 Tropfen Phenolphthalein wird mit 2 n HCl bis zum Umschlag von Rot nach Farblos titriert und mit Ammonreagens auf 12 ml aufgefüllt. Es wird vom Niederschlag abfiltriert und 5 ml des Filtrats mit 1 ml 10%iger Bromcyan-Lösung versetzt und nach 4 min photometriert. Eichkurve siehe Abb. 3.

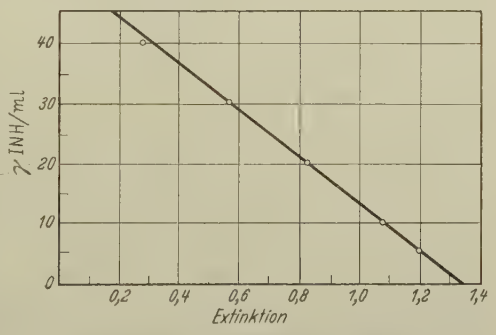


Abb. 3. Eichkurve zur Bestimmung des INH als INS. (Abbau durch Hydrolyse und Oxydation.)

Reagenzien. Gepuffertes Ammonreagens: 87 g K_2HPO_4 p. a. und 107 g NH_4Cl p. a. werden unter Zugabe von 6,7 ml 28%igem Ammoniak zu einem Liter gelöst.

Versuchsergebnisse.

In der Zeit von März bis Dezember 1952 wurden von uns an einer größeren Zahl von kranken und gesunden Versuchspersonen Messungen über die Wiederausscheidung des INH durchgeführt. Durch die Ver-

wendung verschiedenartiger INH-Bestimmungsmethoden war es möglich, gleichzeitig mit den quantitativen Ausscheidungsverhältnissen die so wichtige Frage zu klären, in welcher Form das INH zur Exkretion gelangt, ob frei oder gebunden, oder ob als Säure.

Den Versuchspersonen (VP) wurden einmalig 200 oder 300 mg INH verabreicht. Unmittelbar nach der Medikation wurde der 24stündige Urin gesammelt und aus der gemessenen INH-Konzentration und der Menge des gesammelten Urins die absolute bzw. prozentuale Ausscheidung errechnet. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Tabelle 1. *Ausscheidung von Isonicotinsäurehydrazid durch die Niere.* INH-Bestimmung: mikrobiologisch (1)

Lfd. Nr.	Patient	INH-Präparat	Tagesdosis in g	Ausscheidung (24 Std) in mg	in %
1	La. ♂	Neoteben	0,7	185,6	26,5
2	Ehr. ♂	Neoteben	0,7	93,3	13,3
3	Ri. ♀	Neoteben	0,7	142,7	20,4
4	Mu. ♀	Neoteben	0,8	37,2	4,7
5	To. ♀	Neoteben	0,6	57,6	9,6
6	Mau. ♀	Neoteben	0,6	123,3	20,5
7	Fo. ♀	Neoteben	0,6	19,8	3,3
8	He. ♀	Neoteben	0,5	77,5	15,5
9	Mä. ♀	Neoteben	0,25	24,2	9,7
10	Stü. ♀	Neoteben	0,3	13,9	4,6
11	Eh. ♂	Rimifon	0,25	72,2	28,9
12	Gu. ♂	Rimifon	0,4	18,5	4,6
13	Ja. ♂	Rimifon	0,2	12,2	6,1
14	Kra. ♂	Rimifon	0,25	42,8	17,1
15	Krü. ♂	Rimifon	0,3	36,8	12,3
16	Le. ♂	Rimifon	0,3	14,7	4,9
17	Pe. ♂	Rimifon	0,25	70,7	28,3
18	Po. ♂	Rimifon	0,35	26,8	7,7
19	Rö. ♂	Rimifon	0,3	43,6	14,5
20	We. ♂	Rimifon	0,3	11,0	3,7

Das verabreichte INH wird nur zu einem geringen Prozentsatz in unveränderter Form, also als freies, tuberkulostatisch wirksames INH mit dem Urin ausgeschieden. Bei 86 VP unter Verwendung des mikrobiologischen INH-Nachweises durchgeführte Messungen ergaben im Mittel eine prozentuale Wiederausscheidung von 12,4% der applizierten Dosis. Der niedrigste gemessene Wert betrug 1,5%, der höchste 37%. Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten, wenn der INH-Nachweis mit der von uns modifizierten, vereinfachten chemischen Methode nach Kelly und Poet durchgeführt wurde, die infolge des Verzichts auf die Hydrolyse nur freies INH erfaßt (s. method. Teil unter 2b). In Tab. 1 sind die mikrobiologischen Meßergebnisse über die Wiederausscheidung

von freiem INH bei 20 Patienten des Tuberkulose-Krankenhauses Borstel zusammengestellt. 8 der Patienten erhielten täglich eine INH-Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht, die anderen 12 Patienten eine tägliche Dosis von 4 mg/kg Körpergewicht. Gemessen wurde die Menge des in 24 Std mit dem Urin ausgeschiedenen freien INH. Die Werte streuten zwischen 3 und 30% der applizierten Tagesdosis. Im Mittel fanden wir bei der Gruppe mit der hohen Dosierung eine etwas höhere prozentuale Ausscheidung, nämlich 14,2%, als bei der Gruppe mit der geringeren Tagesdosis, bei der etwa 11,9% als freies, tuberkulostatisch wirksames INH ausgeschieden wurde.

Tabelle 2. *INH-Ausscheidung durch die Niere beim Menschen nach einmaliger oraler Applikation von 200 mg. Messung von März bis Dezember 1952.* INH-Nachweis: mikrobiologisch.

Monat	INH-Gehalt des 24 Std-Urins in Prozent der applizierten Dosis		
	Bö ♂	Krö ♂	Wo ♂
März	2,4	3,6	—
April	2,9	3,8	29,4
Mai	3,1	3,9	30,8
Juni	2,4	4,8	30,0
Juli	2,6	—	—
August	2,4	—	28,9
September	2,4	4,7	30,1
Oktober	2,8	4,5	28,7
November	1,7*	—	14,1*
Dezember	2,7	—	30,5

* Es besteht die Möglichkeit, daß den VP statt 200 mg nur 100 mg INH verabreicht worden ist, da bei beiden die Hälfte der sonst gefundenen prozentualen Ausscheidungswerte gemessen wurde.

Die Ausscheidung von freiem INH scheint eine außerordentlich konstante, für jeden Einzelnen charakteristische Größe zu sein, wie wir an einer kleineren Zahl von VP, bei denen wir die Ausscheidung in monatlichen Abständen über einen Zeitraum von 10 Monaten gemessen haben, nachweisen konnten. Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist für drei männliche VP in Tab. 2 zusammengestellt. 2 von ihnen scheiden von der applizierten Gesamtmenge in 24 Std nur einen geringen Prozentsatz, nämlich 2,7 bzw. 4,2%, als freies, tuberkulostatisch wirksames INH aus. Man könnte sie als „schlechte" INH-Ausscheider bezeichnen, während die dritte VP, die nahezu die 10fache Menge an freiem INH ausscheidet, als „guter" Ausscheider bezeichnet werden müßte. Diese quantitative Besonderheit der Exkretion blieb bei den drei VP in dem gemessenen Zeitraum bestehen. Auch bei anderen VP, gesunden und kranken, konnte der gleiche Befund erhoben werden.

Ein beträchtlicher Teil des applizierten INH wird in gebundener, tuberkulostatisch unwirksamer Form ausgeschieden. Für die Bestimmung dieser Form eignet sich die allgemein gebräuchliche, chemische INH-Bestimmungsmethode nach Kelly und Poet, da sie neben freiem INH alle an der NH_2-Gruppe substituierten Umwandlungsprodukte, soweit diese durch Kochen im sauren Milieu hydrolysierbar sind, erfaßt.

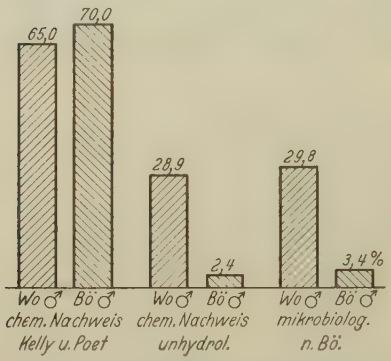


Abb. 4a. INH-Ausscheidung durch die Niere beim Menschen nach oraler Applikation von 200 mg. Sammelurin von 24 Std.

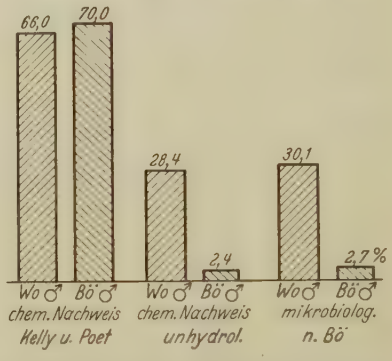


Abb. 4b. INH-Ausscheidung durch die Niere beim Menschen nach oraler Applikation von 200 mg in Kapseln.

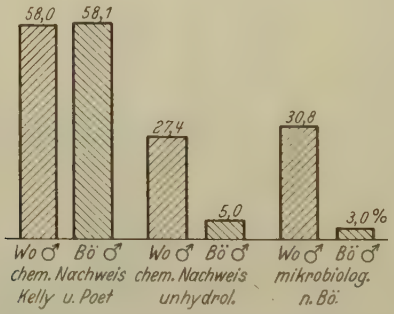


Abb. 4c. INH-Ausscheidung durch die Niere beim Menschen nach intravenöser Applikation von 200 mg.

Die mit Hilfe dieser Methode durchgeführten Messungen über den Gehalt des 24 Std-Urins an freiem und gebundenem INH ergaben Werte von 58—70% der applizierten D sis. Zieht man davon die mit Hilfe der mikrobiologischen oder chemischen, unhydrolysierten Methode gefundenen Beträge für freies INH ab, so erhält man die im 24 Std-Urin enthaltene Menge an gebundenem, tuberkulostatisch unwirksamen INH. Bei „schlechten" INH-Ausscheidern ist diese Menge verhältnismäßig groß und kann bis zu 68% der applizierten Gesamtdosis ausmachen, während sie bei „guten" INH-Ausscheidern entsprechend geringer ist,

immerhin aber den Betrag von 30% übersteigt. Die Umwandlung erfolgt wahrscheinlich im menschlichen Organismus auf enzymatischem Wege. Ob die freie NH_2-Gruppe wie bei den Sulfonamiden mit Essigsäure verestert wird, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Auch konnte noch nicht festgestellt werden, in welchem Organ die Umwandlung erfolgt. Es kann jedoch als gesichert gelten, daß die enzymatische Umwandlung zum gebundenen INH nicht im Magen-Darmkanal erfolgt. Wir untersuchten den 24 Std-Urin auf seinen Gehalt an freiem und gebundenem INH, und zwar einmal nach oraler Medikation von 200 mg INH, das in Form von Tabletten oder in Kapseln, die sich nach Passage des Magens im Dünndarm lösen, gegeben wurde, und zum anderen nach intravenöser Applikation der gleichen Menge. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 4a—c für 2 VP dargestellt. Aus ihnen ist zu entnehmen, daß die gemessenen Beträge für freies und gebundenes INH bei den verschiedenen Applikationsarten wesentliche Unterschiede nicht zeigen, daß also das applizierte INH auch dann in dem gleichen Maße inaktiviert wird, wenn eine Passage durch den Magen-Darmkanal umgangen wird.

Tabelle 3. *Abbau von Isonicotinsäurehydrazid (INH) zu Isonicotinsäure (INS) durch tierische Leber.*

Herkunft der Leber	Menge g	Zugesetztes INH in mg	INS-Gehalt nach 2stündiger Lebereinwirkung	
			in mg	in %
Hund	12	2,4	0,35	14,6
Hund	12	2,4	0,46	19,3
Kalb	12	1,2	0,15	12,1
Kaninchen	12	1,2	0,39	32,3
Kaninchen	12	1,2	0,46	38,7

Etwa 20—25% des oral verabreichten INH werden im menschlichen Organismus zu Isonicotinsäure abgebaut und als solche mit dem Harn ausgeschieden. Die quantitative Bestimmung der Isonicotinsäure erfolgte nach der von Rubin, Drekter, Scheiner und de Ritter angegebenen Methode (s. method. Teil 2c). Nach unseren Untersuchungen besitzt die tierische Leber die Fähigkeit, INH partiell zu Isonicotinsäure abzubauen. In Tab. 3 ist ein Ausschnitt der Ergebnisse unserer diesbezüglichen Versuche zusammengestellt. Die Kaninchenleber zeigt diese Fähigkeit in besonders starkem Maße, während Kalbs- und Hundeleber nur einen verhältnismäßig geringen Teil des zugesetzten INH zur Säure abzubauen vermögen. Alle anderen Organe und Gewebe dieser Tiere (Lunge, Milz, Niere und Muskulatur) waren dazu nicht imstande. Wir glauben auf Grund dieser Versuchsergebnisse zu der Annahme berechtigt zu sein, daß auch im menschlichen Organismus der teilweise Abbau des INH zur Säure in der Leber erfolgt.

Für 2 charakteristische Fälle (Gegenüberstellung eines „guten" und eines „schlechten" Ausscheiders) sind in der Abb. 5 die quantitativen Wiederausscheidungsverhältnisse der Gesamtausscheidung in Form eines Diagramms dargestellt. Während die im 24 Std-Urin enthaltene Menge von Isonicotinsäure bei beiden VP etwa gleich ist, nämlich 20,0 bzw. 21,5%, zeigen die gefundenen Werte für freies und gebundenes INH beträchtliche Differenzen. VP Bö. scheidet freies INH nur zu 2,9% aus; der größte Teil des INH wird zu gebundenem INH enzymatisch inaktiviert. Dieser Anteil beträgt etwa 67,1% der applizierten Dosis. Bei

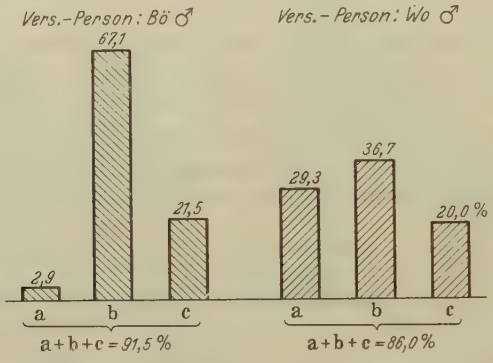


Abb. 5. INH-Ausscheidung durch die Niere beim Menschen in 24 Std. INH-Dosierung: 200 mg per oral. *a* freies INH; *b* gebundenes INH; *c* Isonicotinsäure.

VP Wo. ist der Anteil des freien INH im 24 Std-Urin erheblich höher und erreicht mit 29,3% etwa den 10fachen Betrag. Gebundenes INH ist dagegen in entsprechend geringerer Menge, nämlich 36,7% enthalten. Addiert man die gefundenen Werte für freies, gebundenes und das zur Säure abgebaute INH, so erhält man als Gesamtausscheidung bei beiden etwa den gleichen Betrag, der bei VP Bö. 91,5%, bei VP Wo. 86% der applizierten Dosis ausmacht. Der übrige Teil ist entweder noch nicht zur Ausscheidung gelangt oder hat den Organismus mit Stuhl oder Schweiß verlassen. Diese Prozentzahlen wurden mit unwesentlichen Differenzen sowohl bei einer einmaligen Dosis von 200 mg INH als auch bei einer Dosis von 300 mg erhalten. Die applizierte INH-Dosis scheint demnach zumindest in dem geprüften Bereich keinen Einfluß auf die prozentualen Ausscheidungsbeträge zu haben.

Parallel mit den Exkretionsversuchen durchgeführte Messungen über den INH-Blutspiegel führten zu korrespondierenden Ergebnissen. Bei „schlechten" INH-Ausscheidern konnte freies, tuberkulostatisch wirksames INH im Blut nur in geringer Menge nachgewiesen werden, während „gute" Ausscheider einen entsprechend hohen INH-Blutspiegel aufwiesen. Für gebundenes, tuberkulostatisch unwirksames INH lagen die

Konzentrationsverhältnisse umgekehrt. Davon abweichende Resultate wurden bisher nicht erhalten. Die Kenntnis der INH-Ausscheidung ermöglicht also Rückschlüsse über das Ausmaß der tuberkulostatischen Aktivität des Blutes nach Verabreichung des INH. Als Beispiel seien die mit den verschiedenen INH-Bestimmungsmethoden gemessenen INH-Konzentrationen im Blutserum der beiden VP Wo. und Bö., deren INH-Ausscheidung so stark differiert, wiedergegeben (Tab. 4 u. 5). Beiden VP

Tabelle 4. *Tuberkulostatische Aktivität des Blutserums nach einmaliger oraler Applikation von 300 mg INH.*
Testkeim: Myobact. tuberculosis Typus humanus (Greifswald)
Nährsubstrat: Dubos-Medium.

Blutentnahme in Stunden nach INH-Applikation	Serum-Verdünnung 1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	Kontrolle
I. Versuchsperson Bö. ♂									
Vor Appl.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
½ Std	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 Std	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1½ Std	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 Std	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	+++
3 Std	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4 Std	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6 Std	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
II. Versuchsperson Wo. ♂									
Vor Appl.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
½ Std	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++
1 Std	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++
1½ Std	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++
2 Std	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++
3 Std	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++
4 Std	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6 Std	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++

wurde einmalig 300 mg INH peroral gegeben. Trotz der gleichen INH-Dosis zeigen die INH-Konzentrationen im Blutserum beträchtliche Unterschiede. Bei VP Bö. ist freies, tuberkulostatisch wirksames INH selbst mit dem hochempfindlichen mikrobiologischen Nachweis kaum meßbar. Das Konzentrationsmaximum von 0,4 γ INH/ml wird 1½ Std nach der INH-Medikation erreicht. INH-Konzentrationen von 0,1 γ/ml, der Meßgrenze der mikrobiologischen INH-Bestimmung, und darüber sind nur im Zeitraum von 1½—3 Std nach der Medikation vorhanden. Bei VP Wo. sind die INH-Konzentrationen im Blutserum um ein Vielfaches höher. Noch 6 Std nach der INH-Medikation ist die INH-Konzentration

höher als die von VP Bö. im Konzentrationsmaximum. Das Konzentrationsmaximum bei VP Wo. beträgt 6,4 γ/ml und ist 16mal so hoch wie bei VP Bö. Gleichzeitig mit der chemischen, unhydrolysierten INH-Bestimmungsmethode durchgeführte Messungen bestätigen diese Differenzen (s. Tab. 5, 2 Std-Werte). Die chemische Methode nach Kelly und Poet, die zusätzlich die gebundenen, tuberkulostatisch unwirksamen INH-Anteile erfaßt, damit also zu hohe Werte liefert, kann diese

Tabelle 5. *INH-Konzentration im Blutserum beim Menschen nach einmaliger oraler Applikation von 300 mg.*

Blutentnahme in Stunden nach INH-Applikation	INH-Konzentration in γ/ml					
	Wo ♂			Bö ♂		
	a	b	c	a	b	c
Vor Appl.	—	—	0	—	—	0
½ Std	—	—	3,2	—	—	<0,1
1 Std	—	—	3,2	—	—	<0,1
1½ Std	—	—	6,4	—	—	0,2
2 Std	8,6	4,8	3,2	6,1	<2,0	0,4
3 Std	—	—	1,6	—	—	0,1
4 Std	—	—	0,4	—	—	<0,1
6 Std	—	—	0,8	—	—	<0,1

a Gesamt-INH (Kelly u. Poet); *b* freies INH (chem.); *c* freies INH (mikrobiologisch).

Konzentrationsdifferenzen nicht sichtbar werden lassen. Bei beiden VP führt die INH-Bestimmung nach dieser Methode zu den gleichen Konzentrationen. Aus diesen Befunden wird deutlich, daß diese Methode, die leider in den meisten Kliniken Verwendung findet, für den quantitativen Nachweis von INH in Körperflüssigkeiten und Geweben ungeeignet ist.

Zusammenfassung.

An einer größeren Zahl von kranken und gesunden Versuchspersonen wurden Messungen über die Wiederausscheidung von INH durchgeführt. Die INH-Bestimmung erfolgte mit mikrobiologischen und verschiedenen chemischen Methoden. Die allgemein gebräuchliche chemische Methode nach Kelly und Poet ist nicht spezifisch für INH und erfaßt neben freiem, tuberkulostatisch wirksamen INH auch die an der freien NH_2-Gruppe substituierten, tuberkulostatisch unwirksamen Umwandlungsprodukte, soweit diese durch Kochen im sauren Milieu hydrolysierbar sind. Sie gewinnt an Spezifität, wenn auf die Hydrolyse verzichtet wird. Die so abgewandelte Methode nach Kelly und Poet ist zwar weniger empfindlich, erfaßt aber nur freies INH. Im einzelnen wurden folgende Versuchsergebnisse erzielt:

1. Das verabreichte INH wird nur zu einem geringen Prozentsatz in unveränderter Form, als freies tuberkulostatisch wirksames INH mit dem Urin ausgeschieden. Bei 86 VP, unter Verwendung des mikrobiologischen und chemischen, unhydrolysierten INH-Nachweises durchgeführte Messungen ergaben im Mittel eine prozentuale Wiederausscheidung von 12,4% der applizierten Dosis. Der niedrigste gemessene Wert betrug 1,5%, der höchste 37%.

Die Ausscheidung von freiem INH scheint eine außerordentlich konstante, für jeden Einzelnen charakteristische Größe zu sein.

2. Ein beträchtlicher Teil des applizierten INH wird in gebundener, tuberkulostatisch unwirksamer Form ausgeschieden. Bei „schlechten" INH-Ausscheidern ist diese gebundene Form im 24 Std-Urin bis zu 68% der ordinierten Gesamtdosis nachweisbar, bei „guten" Ausscheidern entsprechend geringer.

In welchem Organ diese Umwandlung erfolgt, konnte bisher nicht geklärt werden. Als gesichert kann jedoch gelten, daß sie nicht im Magen-Darmkanal erfolgt.

3. Etwa 20—30% des oral verabreichten INH wird im menschlichen Organismus zu Isonicotinsäure abgebaut. Nach unseren Untersuchungen besitzt die tierische Leber, insbesondere die des Kaninchens, die Fähigkeit, INH partiell zu Isonicotinsäure abzubauen. Alle anderen geprüften Organe und Gewebe dieser Tiere (Lunge, Milz, Niere, Muskulatur) sind dazu nicht imstande.

4. Parallel mit den Ausscheidungsversuchen durchgeführte Messungen über den INH-Blutspiegel führten zu korrespondierenden Ergebnissen. Bei „schlechten" INH-Ausscheidern ist freies, tuberkulostatisch wirksames INH nur in geringer Menge nachweisbar, während „gute" INH-Ausscheider einen entsprechend hohen INH-Blutspiegel aufweisen. Für gebundenes, tuberkulostatisch unwirksames INH liegen die Konzentrationsverhältnisse im Blut gerade umgekehrt. Die Kenntnis der INH-Ausscheidung ermöglicht also Rückschlüsse über die INH-Konzentration im Blut.

Besonderen Dank schulden wir der med. techn. Assistentin Frau Elfriede Honigmann für ihre sorgfältige Mitarbeit bei diesen Untersuchungen.

Literatur.

Bönicke, R.: [1] Arch. exper Path. u. Pharmakol. **216**, 490 (1952). — Bönicke, R.: [2] Tagungsbericht des Wiss. Beirats des Tuberkulose-Forschungsinst. Borstel v. 3. 5. 1952. — Bönicke, R.: [3] Med. Ges. Kiel, 10. 7. 1952. — Klin. Wschr. **30**, 959 (1952). — Kelly, J. M., and R. B. Poet: Amer. Rev. Tbc. **65**, 484 (1952). — Rubin, S. H., L. Drekter, J. Scheiner and E. de Ritter: Diss. of the Chest **21**, 439 (1952).

Dr. Rudolf Bönicke, Dipl.-Chem. Waltraud Reif,
Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel üb. Bad Oldesloe.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 334—337 (1953).

Aus dem Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz (Chem Abt.).

Weitere Untersuchungen über die reticuloendotheliale Clearance für Makromoleküle.

(V. Mitteilung.)

Der Einfluß von Stickstofflost, Aethylurethan und Triaethylenmelamin auf die RES-Funktion.

Von
MAX FRIMMER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Mai 1953.)

In den vorangegangenen Mitteilungen wurde ein Test beschrieben, der quantative Schlüsse auf die Eliminationsfähigkeit des RES für makromolekulare Fremdkörper zuläßt. Als Testsubstanz dient ein mit ^{32}P markiertes hochpolymeres Phosphat, das nach i. v. Verabfolgung selektiv vom RES aufgenommen wird (FRIMMER (1), GÖTTE und FRIMMER, PFLEGER und FRIMMER). Als Meßgröße dient die Eliminationshalbwertzeit (EHZ), das ist diejenige Zeit, nach der die Konzentration des injizierten Polyphosphats (PP) auf die Hälfte abgesunken ist. In bereits früher mitgeteilten Versuchen (FRIMMER (1, 2)) konnte nachgewiesen werden, daß die EHZ nach Blockade des RES durch Fremdkörper wie Tusche, körperfremde Kolloide und dergleichen zunimmt, was einer Herabsetzung der Clearancefunktion des RES entspricht.

In der folgenden Versuchsreihe wurde nun die medikamentöse Schädigung des RES mit dem PP-Claerancetest untersucht. Die vorwiegend auf Tumoren des lymphatischen und blutbildenden Systems wirksamen Chemotherapeutika N-Lost, Äthylurethan und Triäthylenmelamin erscheinen für diesen Zweck geeignet. Es wurde vorläufig nur die Wirkung auf gesunde Tiere untersucht. Die Pharmakologie der genannten Verbindungen darf hier als bekannt vorausgesetzt werden.

Experimenteller Teil.

Als Versuchstiere dienten wie bisher Hunde. Die Technik des Clearancetestes wurde entsprechend der zweiten Mitteilung beibehalten (FRIMMER[3]). Die bei den Versuchstieren in mehrtägigen Abständen getesteten EHZ-Werte wurden in Indexprozente umgerechnet, um die Ergebnisse verschiedener Versuche vergleichen zu können. Der individuelle Normalwert jedes unvorbehandelten Tieres wird gleich

100% gesetzt. Zeitpunkt und Art der Verabfolgung der Chemotherapeutika, sowie Dosierung geht aus den Kurven hervor. Es wurde jeweils mit verhältnismäßig hoher Dosis gearbeitet, um signifikante Ausschläge zu erzielen. Ein Teil der Versuchstiere kam ad exitum.

Ergebnisse und Diskussion.

Sinalost. Erwartungsgemäß nimmt die RES-Clearancefunktion nach N-Lostgaben ab. In Abb. 1 ist ein derartiger Versuch kurvenmäßig dargestellt, wobei die EHZ-Indexprozente gegen die Zeit aufgetragen sind. Man sieht, daß der Gipfel der EHZ-Verlängerung erst einige Zeit nach der letzten N-Lostinjektion auftritt. Die Erholung des RES tritt verhältnismäßig rasch ein. Am 8. Tag nach dem Gipfel der EHZ-Kurve wird der Normalwert wieder erreicht. Bei einzelnen Tieren wird er sogar etwas unterschritten. Anschließend erfolgt ein abermaliger Anstieg, der allerdings nie die Höhe des ersten erreicht. Die Deutung dieses Befundes ist schwierig. Möglicherweise handelt es sich um eine Spätwirkung des N-Lost.

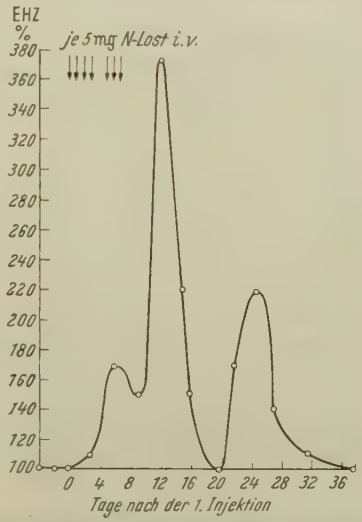


Abb. 1. RES-Clearancekurve nach Injektionen von N-Lost.

Es könnte auch daran gedacht werden, daß die erste Erholung nur eine scheinbare ist. Möglicherweise kommt es in dieser Phase infolge toxischer Schädigung der Kapillarwände zu einem vermehrten Austritt von PP in extravasale Räume, wodurch eine Erholung vorgetäuscht werden könnte. Weiterhin muß bei der Deutung der Befunde an eine Beteiligung der Nebennierenrinde gedacht werden. Diese ist, wie in einer späteren Mitteilung[1] gezeigt werden wird, von entscheidender Bedeutung für die Clearancefunktion des RES. Nach Urethan und N-Lost werden an den Nebennieren tatsächlich morphologische Veränderungen beobachtet. So könnte die Doppelgipfeligkeit der Kurven durch eine Überlagerung zweier getrennter Vorgänge, deren Maxima an zeitlich verschiedenen Punkten liegen, erklärt werden. Derartige Überlegungen können vorläufig allerdings nur hypothetischen Charakter haben.

Äthylurethan. Abb. 2 zeigt eine Kurve bei sehr hoher Urethandosis. Entsprechend der geringeren Toxizität (keine Todesfälle) erreicht der EHZ-Gipfel nicht dieselbe Höhe wie der nach N-Lostgaben. Nach Absetzen des Mittels tritt sofort eine Normalisierung mit Verkürzung der EHZ-Werte ein. Die Normalwerte werden häufig für kurze Zeit unterschritten. Auch beim Urethan erfolgt ein Wiederanstieg.

[1] VII. Mitt.

Triaethylenmelamin. Abb. 3 zeigt einen Versuch mit einer einmaligen Gabe von 0,5 mg/kg. Die Kurve entspricht qualitativ denen auf Abb. 1 und 2. Das Wirkungsmaximum wird erst nach 6 Tagen erreicht. Die Größe des Ausschlags ist wie bei Lost und Urethan deutlich dosisabhängig. Die Anzahl unserer bisherigen Versuche reicht allerdings für eine statistische Auswertung einer Beziehung zwischen Dosis und EHZ-Maximalwert nicht aus. Beim TEM ist die Mortalität bei höheren Dosierungen erheblich. Charakteristisch ist auch hier die Unterschreitung des individuellen Normalwertes im Stadium der Regeneration und der

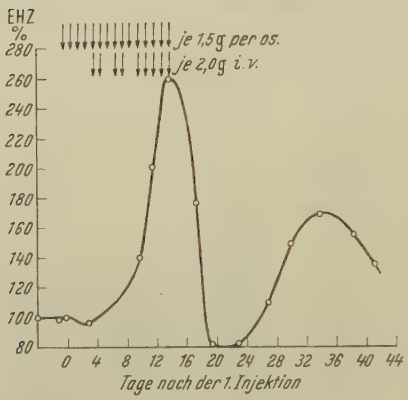


Abb. 2. RES-Clearancekurve nach Verabfolgung von Urethan. Obere Pfeile: perorale Gaben. Untere Pfeile: i. v. Injektionen.

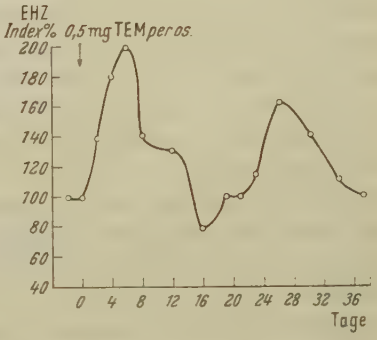


Abb. 3.
RES-Clearencekurve nach einmaliger Verabfolgung von Triaethylenmelamin.

darauffolgende Wiederanstieg. Aus den Versuchen kann geschlossen werden, daß nach allen 3 Medikamenten am RES bezüglich des Eliminationsvermögens für Makromoleküle ähnliche Verhältnisse herrschen.

Zusammenfassung.

1. Die RES-Clearance für Polyphosphat nimmt nach Gaben von N-Lost, Äthylurethan und Triäthylenmelamin in Abhängigkeit von der Dosis ab.

2. Das Maximum der Wirkung wird bei N-Lost und TEM erst einige Tage nach der letzten Verabfolgung erreicht. Beim Urethan erfolgt sofort nach Absetzen des Medikaments eine Zunahme des Eliminationsvermögens.

3. Die Erholung des RES vollzieht sich nach Urethan am schnellsten, etwas langsamer nach Lost und TEM. In der Regel werden im Stadium der Regeneration für kurze Zeit Clearancewerte erreicht, die größer als die individuellen Normalwerte vor dem Versuch sind.

4. Bei allen drei Stoffen erfolgt ein nochmaliges Absinken des Eliminationsvermögens.

Die Versuchsmengen von *Sinalost* wurden von den Nordmark-Werken G. m. b. H., Hamburg, von Urethan und Triaethylenmelamin von den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Literatur.

Frimmer, M. (1): Diese Z. **217**, 91 (1952). — Frimmer, M. (2): Diese Z. **218**, 320 (1953). — Frimmer, M. (3): Diese Z. **218**, 313 (1953). — Götte, H., u. M. Frimmer: Angew. Chem. **65**, 52 (1953). — Pfleger, K., u. M. Frimmer: Diese Z. **218**, 479 (1953).

Dr. Max Frimmer, Pharmakol.-Institut der Universität, Münster/Westf., Westring 12.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 338—350 (1953).

Aus der I. Medizinischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg in Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. W. Bansi).

Beitrag zur Kenntnis des Natrium- und Kaliumstoffwechsels beim Leberparenchymschaden.

Von

W. D. v. Schönberg.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Januar 1953.)

„Keine menschliche Forschung kann
sich wahre Wissenschaft nennen,
wenn sie nicht mathematische
Beweisführung hat."

Leonardo da Vinci[80]

Nachdem bereits Cohnheim und Lichtheim[25], Starling[116] und Hashimoto[69] auf Zusammenhänge zwischen der Funktion der Leber und dem Wasserhaushalt hingewiesen hatten, erarbeiteten vor allem Pick[93, 94, 95] und seine Schüler weitere experimentelle Grundlagen. Sie beschrieben die Funktion der Leber als die eines Stauweihers, welcher die Aufgabe hat, das durch die Wasserresorption aus dem Magen-Darmtrakt verdünnte Blut wieder auf seine optimale Konzentration zu bringen und das abgefangene Wasser entweder direkt der Niere, oder zunächst den Ausweichdepots in der quergestreiften Muskulatur zuzuleiten. Diese Aufgabe der Leber sah Pick aber schon damals als Partialfunktion im Rahmen eines übergeordneten diencephalen Regulationsmechanismus (Salz-Wasserzentrum im Hypothalamus, Kahlerscher Salzstich) an, und in der Tat lassen auch neuere Befunde an Hirnverletzten[2, 21, 22, 83, 103, 105] keinen Zweifel an der Bedeutung dieser Zentren — vor allem für die Serumkonzentration von Natrium und Chlor. Während Pick jedoch fand, daß das „Adiuretin" des Hypophysenhinterlappens (HHL) intralumbal wirksamer war als intravenös und deshalb für dieses antidiuretische Prinzip einen zentralnervösen Angriffspunkt annahm, neigen neuere Untersucher zu der entgegengesetzten Auffassung einer Stimulierung des HHL durch (hypothetische) *Volumen- bzw. Osmoreceptoren* im Nucleus supraopticus[26, 54, 86, 91, 106, 123, 124]. Da sich das antidiuretische Prinzip des HHL bisher nicht von dem — blutdrucksteigernden — *Vasopressin* (VP) trennen ließ und das Vorliegen zweier getrennter Faktoren auch zunehmend unwahrscheinlich geworden ist[113], wird in der Folge nur noch die letztere Bezeichnung gebraucht. — Man hat nun nachgewiesen, daß VP in vitro durch Leberhomogenisate inaktiviert wird[45, 68] und daß seine Wirkung bei intraportaler Injektion schwächer ist als bei intra-

venöser[16], so daß es nahe lag, die Diuresehemmung beim dekompensierten Leberparenchymschaden durch einen verminderten Abbau des VP durch die geschädigte Leber zu erklären[39, 87, 101]. Dagegen konnte WHITE[126] zeigen, daß VP beim Leberkranken und beim Gesunden quantitativ und qualitativ die gleiche Diuresehemmung bewirkt, so daß eine mangelnde Inaktivierung beim Leberkranken unwahrscheinlich ist. Er glaubt daher — gemeinsam mit EISENMENGER[43] und HOAGLAND[66] — auf eine Überproduktion von VP beim dekompensierten Leberparenchymschaden schließen zu müssen. Nun hat man zwar sowohl beim Menschen wie auch im Tierexperiment beim dekompensierten Leberparenchymschaden (Cirrhosis hepatis) im Blut, Urin und Ascites antidiuretische Substanzen nachweisen können, welche beim Gesunden in diesen Mengen nicht gefunden werden[11, 17, 67, 70, 73, 84, 101, 107, 117], doch ist ihre Identität mit dem VP noch keineswegs erwiesen[3, 15, 101, 107] obwohl sie nach Hypophysektomie nicht mehr nachweisbar sind[57, 97, 123, 124]. AMES[3] fand sogar, daß sie sich hinsichtlich ihres Verhaltens in der Ultrazentrifuge und bei der Dialyse deutlich vom VP unterschieden, und SMITH[108] konnte zeigen, daß — im Gegensatz zum VP — diese Substanzen beim Hund *keine* Antidiurese auslösen. Weiter kann man auch noch einwenden, daß im Falle des dekompensierten Leberparenchymschadens nicht nur Wasser, sondern in sehr erheblichem Maße auch Natrium retiniert wird[1, 24, 27, 40, 41, 46, 47, 48, 52, 55, 58, 79, 99], so daß im Urin häufig nur wenige Milligramm (!) pro die gefunden werden, während die Kaliumausscheidung relativ hoch ist[112]. Da nun nachgewiesen werden konnte, daß VP selbst keinen direkten Einfluß auf die Ausscheidung von Natrium, Chlor und Kalium im Urin hat[13, 126], müssen zumindest noch weitere Faktoren an der Ödembildung beteiligt sein. In jüngster Zeit setzt sich deshalb zunehmend die Ansicht durch, daß es sich bei diesem Vorgang um eine komplexe Störung verschiedener physiologischer Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Homöosthase handelt[12, 43]. — So hat man z. B. nach SELYE[113] in dem *Oxytocin*, welches normalerweise im HHL neben dem VP in einem Verhältnis von 1:8 enthalten ist, in dieser Hinsicht einen Gegenspieler zum VP zu sehen, da es an Ratten noch in einer Dosierung von 0,0000004 Milligramm (!) eine deutliche diuretische Wirkung zeigt.

Neben diesen zentralnervösen Regulationen (einschließlich der pars nervosa der Hypophyse) sind es vor allem der Hypophysenvorderlappen (HVL) und die Nebennierenrinde (NNR), deren Einfluß auf den Wasser- und Elektrolythaushalt näher erforscht sind. Die sogenannten *Mineralocorticoide* — vom Wirkungstyp des Desoxycorticosterons (DCA) — senken den *Natrium/Kalium-Index* (s. S. 342) im Schweiß, Speichel und Urin[12, 18, 42, 59, 82, 110, 118], so daß verschiedene Autoren diesen Index in den genannten Körperflüssigkeiten unter bestimmten Voraussetzungen geradezu als Maßstab für die mineralocorticoide Aktivität der NNR

ansehen[18, 19, 53, 82, 110, 127] — zumal sich mittels radioaktiven Natriums und Kaliums an der adrenalektomierten Ratte zeigen läßt, daß innerhalb physiologischer Grenzen der Na/K-Index eine einfache analytische Funktion der zugeführten Menge an DCA ist[102, 118]. Eine Senkung dieses Index im Blut führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Corticoiden durch die NNR[5, 122]. Bei erhaltener NNR-Funktion hat *ACTH* die gleiche Wirkung[12, 60, 78, 127] und auch die *Keimdrüsenhormone* vermögen einen mineralocorticoiden Effekt zu erzielen[85, 100, 119, 120, 121], welcher über eine Stimulierung der Hyphopyse zustande kommt[71]. Im Gegensatz zum VP fördern zwar Mineralocorticoide die Wasserausscheidung[49, 59, 113], doch kann diese Wirkung dadurch überdeckt werden, daß *als Folge* der Natriumretention auch eine Diuresehemmung auftritt[113]. Während Ingle[72] jedoch die Na/K-Verschiebungen auf eine unmittelbare Hormonwirkung bezog, genügt nach Harrison und Darrow[64] der normale Einfluß der NNR auf die tubuläre Rückresorption in der Niere vollkommen zur Erklärung des Wirkungsmechanismus. Es liegen viele Beweise vor, daß die Natriumretention beim Leberparenchymschaden tatsächlich durch eine vermehrte tubuläre Rückresorption zustande kommt[52, 55, 99]. Ein Zusammenhang dieses Phänomens mit der Funktion der NNR ist bisher jedoch weder bewiesen noch widerlegt worden[12]. Ein anderer renaler Mechanismus scheint jedenfalls nicht beteiligt, da das Glomerulusfiltrat und der Plasmadurchfluß beim dekompensierten Leberparenchymschaden normal sind[46, 98, 107] — wenn auch Ausnahmen vorzukommen scheinen[88]. Ein übergeordneter neuro-hormonaler Einfluß ist aber schon deshalb anzunehmen, weil ja die Natriumretention nicht nur im Urin, sondern auch im Schweiß und im Speichel nachgewiesen werden kann[42].

Kaplan und Rapoport[76] haben gefunden, daß auch der *Sympathicus* einen Einfluß auf die Natriumrückresorption durch die proximalen Nierentubuli ausübt. Dabei ist der Sympathicuswirkstoff in seinem Einfluß auf den Elektrolytstoffwechsel[23, 28, 29, 77] — im Gegensatz zum Insulin[32] — offenbar von der Nebenniere und der Hypophyse unabhängig[30, 31, 33], so daß auch dem vegetativen Nervensystem eine selbständige Steuerungsfunktion zukommt, welche wahrscheinlich mit der der hypothalamischen Zentren identisch ist. Als Angriffspunkt — zumindest der *Vagus*reizstoffe — hat man die Zellmembran erkannt[92]. Kaliumverlust aus den Geweben — im Austausch gegen Natrium — nach Behandlung mit Acetylcholin[50] oder Cholinesteraseinhibitoren[56] beruhen auf einer gesteigerten Zellpermeabilität.

Schließlich greifen noch die verschiedensten *Stoffwechselfaktoren* in den Wasser- und Elektrolythaushalt ein, von denen nur die wichtigsten genannt werden können. — Verständlicherweise wird zur Aufrechterhaltung der Konzentrationsunterschiede der Elektrolyte zwischen cellulärem

und extracellulärem Raum Energie benötigt, welche vorwiegend aus der Glucose gewonnen wird[34, 51, 65, 75] und von einer ausreichenden Sauerstoffversorgung abhängig ist[20, 35, 65, 90, 104]. So benötigen z. B. Erythrocyten zur Aufnahme von einem Millimol Kalium die Energie aus einem Millimol Glucose (!)[125]. Mit dem Zellwasser und beim Eiweißzerfall geht naturgemäß auch Kalium zu Verlust[44]. Natriumzufuhr bewirkt eine funktionelle Atrophie, Kaliumzufuhr eine funktionelle Hypertrophie der NNR[5]. Schließlich spielt auch das Säure/Basengleichgewicht eine wichtige Rolle[36, 37, 38, 51, 96].

Die bedeutsame Funktion der Leber im Wasser- und Mineralhaushalt wurde schon eingangs besprochen. Während ihr jedoch früher auch ein direkter Einfluß auf den Natrium- und Kaliumstoffwechsel zugeschrieben wurde[6, 7, 8] und manche Autoren sogar glaubten, diuretische und antidiuretische Leberhormone nachweisen zu können[61, 62, 93], weiß man bis heute nur, daß zumindest eine ihrer Wirkungen auf den Wasser- und Salzhaushalt auf ihrer Fähigkeit zum Abbau, bzw. zur Inaktivierung der Hormone der Hypophyse und Nebennierenrinde beruht[45, 68, 113]. Nach neuesten Untersuchungen vermag sie sogar weniger wirksame Corticoide in wirksamere Fraktionen umzuwandeln[4]. Trotz zahlreicher Arbeiten wissen wir dennoch noch immer nichts Sicheres über die Rolle der Leber beim Zustandekommen der Wasser- und Natriumretention bei der dekompensierten Lebercirrhose. Im Falle einer unmittelbaren Verknüpfung dieses Phänomens mit der Leberfunktion könnte man es auch bei anderen Störungen derselben erwarten. Tatsächlich ist eine Neigung zur Wasserretention (pathologischer Ausfall des Volhardschen Wasserversuches) auch bei der einfachen Hepatitis beschrieben worden[10, 128] und auch eine Retention von Natrium — bei gleichzeitig erhöhter Kaliumausfuhr — wurde auf der Höhe der Erkrankung bei der Hepatitis gefunden[9, 63]. Anders ausgedrückt entspricht dies einer Erniedrigung des Na/K-Index im Urin Hepatitiskranker. Man könnte theoretisch ein solches Indexverhalten einfach dadurch zu erklären versuchen, daß eben beim Untergang (kaliumreicher) Parenchymzellen vermehrt Kalium zur Ausscheidung anfällt, doch wäre damit nur die Erhöhung der Kaliumausfuhr und nicht auch die gleichzeitige Verminderung der Natriumausscheidung erklärt. Auch eine Drosselung der Verbrennungsvorgänge führt — wie erwähnt — zwar zu Kaliumverlusten des intracellulären Raumes, doch fehlt in einem solchen Fall auch die Energie zu vermehrten tubulären Rückresorption von Natrium.

Zur Zeit kennen wir keinen endogenen Faktor, welcher die Natrium- und Kaliumausscheidung der verschiedenen Sekretions- und Exkretionsorgane (bei unverändertem Serumspiegel) gleichzeitig und gegensinnig zu beeinflussen vermag — mit Ausnahme der Halosteroide bzw. der ihnen übergeordneten Hormone des HVL.

Ob man deshalb jedoch — wie Conn, Locke, Frawley und Warming-Larsen — diesen NA/K-Index zum Maßstab der Nebennierenrindenfunktion machen darf, kann erst die weitere Forschung lehren, welche versuchen muß, diesen Index zur Mineralocorticoidserumkonzentration in quantitative Beziehung zu setzen. Das scheitert bisher noch an methodischen Schwierigkeiten. In der Zwischenzeit sind wir darauf beschränkt, unser Wissen um das Verhalten dieses zweifellos interessanten Index zu erweitern, ohne daraus bindende Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Regulationsmechanismus ziehen zu können. Die nachfolgenden Untersuchungen prüfen dieses Indexverhalten bei der unkomplizierten Hepatitis und im Coma hepaticum.

Wir maßen zu diesem Zweck die Natrium-, Kalium- und Wasserausscheidung im Tagesurin (24 Std) Hepatitiskranker. Als Maßstab der Schwere der Erkrankung des Einzelfalles wurde der maximale Bilirubinwert im Serum gewählt, welcher sich mit dem klinischen Bild am besten deckte. Die Patienten erhielten krankenhausübliche Leberschonkost. Die Natrium- und Kaliumanalysen erfolgten mit dem Flammenphotometer[109].

Da für unsere Fragestellung die Relation der Natrium- zur Kaliumausfuhr im Vordergrunde stand, betrachteten wir nicht die absoluten Ausscheidungsgrößen, sondern einen Index, welchen wir als den Logarithmus des Quotienten $\frac{\text{Natrium (mg\%)}}{\text{Kalium (mg\%)}}$ definierten[110]. Die Unbedenklichkeit einer Vernachlässigung der Absolutausscheidungen zugunsten des Index (I) wird in dem Abschnitt *Statistik* nachgewiesen werden. Die Vorteile eines solchen Vorgehens liegen andererseits klar auf der Hand, da die Absolutwerte naturgemäß sehr viel abhängiger von der — leider doch immer schwankenden — Elektrolytzufuhr sind; solange sich in der Nahrung nur das *Verhältnis* der zu untersuchenden Elemente zueinander nicht allzu stark verschiebt, ist es gleichgültig, wieviel der Patient ißt — und auch der Verlust eines kleinen Teiles des Tagesurins — etwa beim Stuhlgang — ist kein großes Unglück mehr. Nächst der einwandfreien Elektrolyt*bilanz*, welche bei größeren Untersuchungsreihen über längere Zeit praktisch undurchführbar ist, hat sich uns der Index wegen seiner großen Handlichkeit im täglichen klinischen Gebrauch am besten bewährt.

Statistik.

Es wurden 113 Fälle untersucht, davon: 90 Fälle einfacher Hepatitis; 12 Fälle von Coma hepaticum; 4 Fälle von Lebercirrhose; 7 Normalfälle (zur Eichung).

Für die Wasser-, Kalium- und Natriumausscheidung im Sammelurin (24 Std) Leberkranker wurden je 3535 Meßpunkte gewonnen, davon: 3271 bei Fällen von einfacher Hepatitis; 176 bei Fällen von Coma hepaticum; 46 bei Fällen von Lebercirrhose; 42 bei Normalfällen.

Für den Index (I) wurden 3570 Meßpunkte gewonnen, davon 2970 bei einfacher Hepatitis; 509 im Präkoma und Coma hepaticum; 89 bei Kontroll- und Cirrhosemessungen.

Die untersuchten Fälle wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt: I Maximaler Bilirubinwert (im Serum) von 0,0—9,9; II Maximaler Bilirubinwert (im Serum) von 10,0—19,9; III Maximaler Bilirubinwert (im Serum) von 20,0—29,9; IV Maximaler Bilirubinwert (im Serum) von 30,0 bis —; (V) Präkomafälle; VI Coma hepaticum.

Die Aussonderung der Komafälle und der Fälle von Präkoma erwies sich als notwendig, da sie ein vollkommen abweichendes Verhalten des Index erkennen

ließen. Die Gruppe V wird — soweit sie nicht gesondert untersucht werden soll — auf die Gruppen I—IV aufgeteilt.

Abkürzungen. $I = \log \frac{Na}{K}$ (mg%); n = Zahl der Beobachtungstage; N = Zahl der beobachteten Fälle; t = Variable der Stundenverteilung; F = Variable der Fischerverteilung; P = Wahrscheinlichkeit *in Prozent*; f = Freiheitsgrad; s = Streuung.

Sämtliche Serum- und Erythrocytenanalysen lagen — in Übereinstimmung mit anderen Autoren[9, 63] — im Bereiche der Norm und bleiben daher unberücksichtigt.

Die Grundlagen der statistischen Untersuchungen wurden den Lehrbüchern von Kendall[74] und von Linder[81] entnommen.

Entsprechend der in der Einleitung erläuterten Fragestellung suchen wir eine Antwort auf die folgenden beiden Fragen:

1. Ist der Gebrauch des Index (I) an Stelle der absoluten Ausscheidungsgrößen statistisch unbedenklich oder nicht?

2. Finden sich signifikante Indexverschiebungen —.

a) Zwischen leichten und schweren Fällen bzw. zwischen Krankheitshöhepunkt und Rekonvalescenz bei *einfacher* Hepatitis?

b) Zwischen geheilten und zum Tode führenden Hepatitisfällen?

Die hohe Zahl der Meßpunkte macht es wahrscheinlich, daß diese Fragen in statistisch signifikanter Weise beantwortet werden können.

Betrachtet man die Absolutausscheidung der Elemente Natrium und Kalium in den Gruppen I—IV und setzt die Werte der Gruppe I gleich „Eins", so erhält man nach der Tab. 1, Abschnitt A, die folgenden Reihen:

		I	II	III	IV
Bezogen je Fall:	Na:	1	1,2	1,6	1,8
	K:	1	1,1	1,5	1,7
Bezogen je Tag:	Na:	1	1,1	1,1	1,0
	K:	1	1,0	1,0	0,9

Daraus ergibt sich, daß die Natrium- und Kaliumwerte bei Mittelung der ganzen Gruppen gleichlaufen. Aus der Betrachtung der Bestimmtheitsmasse und Regressionskoeffizienten in Tab. 1, Abschnitt B und C, ergibt sich ferner, daß eine ausreichende Bindung zwischen den Natrium- und Kaliumwerten besteht, um die Verwendung des Index nutzbringend erscheinen zu lassen. Diese Bindung ist aber auf der anderen Seite nicht so stark, daß der Index zur Trivialität erniedrigt würde. Eine Unterscheidung der Bindung auf der Höhe der Erkrankung gegenüber der Rekonvalescenz ist nicht möglich, was gleichfalls für die Güte des propagierten Index spricht. Die Umrechnung unseres Index (I) in einen molaren Index, wie er sich in den angelsächsischen Ländern eingeführt hat, erfolgt durch Multiplikation mit dem Faktor 1,7.

Bereits aus der oben durchgeführten groben Abschätzung ergibt sich die Vermutung, daß ein Unterschied der Indexwerte geheilter Fälle im Sinne der Fragestellung nicht besteht. Genaueren Aufschluß ergibt jedoch erst die Streuungszerlegung nach Fischer (siehe bei [74]):

1. Betrachtung der Indexmittelwerte der Gruppen I—IV für die *Gesamtdauer* der Beobachtung:

Gruppe	Zahl der Kranken	$\sum I_x$	$\sum I_x^2$	I_x (Mittelwert)	Beobachtungstage
I	15	51,454	41,715	+ 0,119660	430
II	35	138,020	76,851	+ 0,129962	1062
III	21	104,173	84,559	+ 0,125965	827
IV	13	79,626	50,057	+ 0,121939	653
V	7	7,354	58,686	+ 0,021254	346
VI	12	— 87,518	94,578	— 0,536920	163

Es ergeben sich somit die folgenden Zerlegungen:

Gruppe I—IV	f	Σ^2	$\frac{\Sigma^2}{f}$
Gruppenstreuung	3	0,044238	0,014746
Reststreuung	2968	206,291527	0,069505
Gesamtstreuung	2971	206,335765	
Gruppe $\sum_I^{IV}$: VI			
Gruppenstreuung	5	69,392040	13,878410
Reststreuung	3475	312,408794	0 089902
Gesamtstreuung	3480	381,800834	

Daraus folgt:

Beim Vergleich der Gruppen I—IV erweist sich die Reststreuung als wesentlich größer als die Gruppenstreuung, so daß keine Signifikanz vorliegt. Die Mittelwerte können derselben Grundmenge entstammen.

Vergleicht man dagegen die zusammengefaßten Gruppen I—IV mit der Gruppe VI, so ist $F = \frac{13{,}878}{0{,}089} = 154{,}373$ bei $n_1 = 5$ und $n_2 = 3475$.

Damit ist die Signifikanz gesichert, da die Sicherheitspunkte für $P = 0{,}1$ bei $F = 4{,}10$ liegen.

Die Mittelwerte der zusammengefaßten Gruppen I—IV und diejenigen der Gruppe VI entstammen nicht derselben Grundmenge.

Prüft man schließlich die Mittelwerte der Gruppen I und VI mit Hilfe der Studentverteilung, so ergibt sich auch daraus die Sicherung des Unterschiedes, denn es ist:

$$t = 19{,}032 \quad \text{bei } n = 591$$

für einen Tafelwert von $t = 3{,}310$ bei $P = 0{,}1$.

2. Noch genauer als die Betrachtung der Gesamtdauer der Erkrankung ist das folgende Verfahren:

Wir fixieren den Erkrankungshöhepunkt, welcher bei der einfachen Hepatitis am besten durch den maximalen Bilirubinwert im Serum festgelegt werden kann und betrachten dann die darauf folgenden 40 Tage. Auf diese Weise können sich keine Wirkungen durch Interferenz aufheben. Da es — entsprechend der Fragestellung — ja lediglich darauf ankommt, ob sich auf der Höhe der Erkrankung eine

Indexerniedrigung (oder -erhöhung) nachweisen läßt oder nicht, haben wir die unregelmäßig und ohne erkennbare Tendenz geringfügig schwankenden mittleren Tagesindizes (Abb. 1) aus technischen Gründen in 8 Abschnitte zu je 5 Tagen unterteilt und eine Streuungszerlegung angesetzt:

	f	Σ^2	$\frac{\Sigma^2}{f}$
Gruppenstreuung	3	0,005 648 448	0,001 883
Abschnittsstreuung	7	0,023 204 688	0,003 318
Reststreuung	21	0,051 531 054	0,002 454
Gesamtstreuung	31	0,080 384 190	

Damit ergeben sich Werte von $F = 0{,}768$ und $F = 1{,}352$ bei $n_1 = 3$ bzw. 7 und $n_2 = 21$. Beide Werte sind nicht signifikant, da die 5% Werte bei $F = 3{,}072$ und $F = 2{,}573$ liegen.

Tabelle 1.

Werte:	Gruppen: I	II	III	IV	Σ_I^{IV}	VI
A. Allgemeine Daten und Mittelwerte.						
Tage	369	1034	859	926	3271	176
Fälle	13	34	21	18	90	12
Tage pro Fall	28,4	30,4	40,9	51,4	36,3	14,7
H_2O (Liter pro Fall)	33,9	33,4	54,8	65,4	44,7	8,20
Na (Gramm pro Fall)	60,4	72,5	97,3	107,8	83,8	7,04
K (Gramm pro Fall)	48,4	53,7	71,1	82,2	62,1	11,93
H_2O (Liter pro Tag)	1,20	1,10	1,34	1,27	1,23	0,558
Na (Gramm pro Tag)	2,12	2,38	2,38	2,10	2,30	0,480
K (Gramm pro Tag)	1,70	1,76	1,74	1,60	1,71	0,815
Index pro Tag	0,070	0,115	0,102	0,083	0,097	−0,585
Index (berechnet*)	0,092	0,112	0,120	0,140	0,127	−0,188
B. Bestimmtheitsmaße.						
Na:K (pro Fall)	24,1	29,6	20,3	26,9	26,4	18,9%
Na:K (pro Gruppe)	22,4	41,5	18,8	29,4	28,6	17,5%
C. Regressionskoeffizienten.						
Na:K (pro Fall)	0,655	0,739	0,637	0,750	0,757	0,366
K:Na (pro Tag)	0,270	0,449	0,327	0,522	0,454	0,388
Na:K (pro Gruppe)	0,779	0,980	0,893	0,683	0,814	0,378
K:Na (pro Gruppe)	0,286	0,423	0,322	0,430	0,352	0,461

* Berechnet aus den Werten $\frac{Na}{Tag}$ und $\frac{K}{Tag}$.

In den Abteilungen B und C bedeutet „pro Fall", daß die Werte für jeden Fall errechnet und in den Gruppen I—IV gemittelt wurden; ebenso bedeutet „pro Gruppe", daß die Werte für die Gruppe als Ganzes berechnet und dann durch die Zahl der Fälle geteilt wurden.

3. Schließlich wurde noch für jeden einzelnen der 40 Tage nach dem Krankheitshöhepunkt die Gruppe I—IV mit Hilfe der Streuungszerlegung verglichen, wobei sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ergaben. Vergleicht man dagegen die ersten 15 Tage aller

geheilten Fälle (Gruppe I—IV) nach dem Krankheitshöhepunkt mit den im Coma hepaticum verstorbenen Fällen (Gruppe VI) — indem man die letzteren sinngemäß rückwärts einsetzt — so ergibt sich, daß für jeden Tag, mit Ausnahme des ersten, die Werte signifikant unterschieden sind.

Auf die Wiedergabe dieser und verschiedener weiterer Berechnungen muß aus Raumgründen verzichtet werden.

Diskussion.

Die statistische Durcharbeitung eines ausreichenden Zahlenmaterials hat also ergeben, daß sich bei der einfachen Hepatitis keine Verschiebungen in dem gewohnten Ausscheidungsverhältnis der Elemente Natrium und Kalium erkennen lassen — gleichgültig, ob man den Ablauf der Erkrankung des Einzelfalles oder gleiche Erkrankungsphasen sämtlicher Fälle vergleicht (vgl. auch Abb. 1).

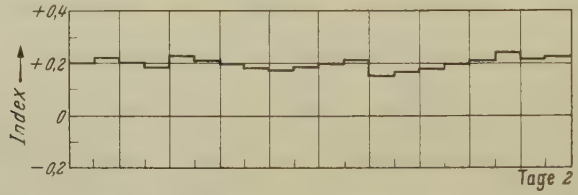


Abb. 1. Indexmittelwertskurve von 90 Fällen von einfacher Hepatitis (40 Tage nach dem Krankheitshöhepunkt, in Gruppen von je 2 Tagen zusammengezogen). Die Kurve bildet nahezu eine Waagerechte; jeder Wert ist positiv.

Auf die gleichzeitige Beurteilung der Wasserbilanz wurde trotz sorgfältiger Messung der Zufuhr und Ausfuhr verzichtet, weil dabei allzu viele Ungenauigkeitsfaktoren hätten in Kauf genommen werden müssen, welche sich nicht durch den Ersatz der absoluten Werte durch Verhältniszahlen hätten mildern lassen. Eine meßbar Hydrämie konnten wir — an Hand der Hämatokritwerte — praktisch nur bei einigen Fällen von Coma hepaticum nachweisen. Die Bestimmung des extracellulären und des Gesamtkörperwassers wurde nicht durchgeführt.

Mit diesen Ergebnissen befinden wir uns in Widerspruch zu anderen Autoren[9, 63], welche allerdings kein statistisch durchgearbeitetes Material unterbreitet haben, so daß eine Beurteilung der Signifikanz ihrer Meßergebnisse nicht möglich ist. Es lassen sich aber auch noch zwei weitere Gründe anführen, welche die unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären vermögen. Einmal standen die Verfasser unter dem irrtümlichen Eindruck, daß das DCA bei der Hepatitis eine paradoxe Wirkung entfalte — was inzwischen eindeutig widerlegt werden konnte[110]. Die Nichtberücksichtigung des mineralocorticoiden Behandlungseffektes der — zum Teil mit erheblichen Mengen — DCA behandelten Fälle verfälscht daher deren Ergebnisse, während die Sammelkurve der 56 unbehandelten Fälle von Benda und Rissel ohnehin keine signifikanten Elektrolytverschiebungen erkennen läßt — wie man aus den Werten der graphischen Darstellung unschwer errechnen kann. Ein weiterer Grund für die

Diskrepanz der Ergebnisse könnte darin liegen, daß wir die Fälle von Coma hepaticum gesondert betrachtet haben — sofern bei den genannten Autoren derartige Fälle in ihre Mittelwertskurven einbezogen sind und sich der Effekt vielleicht sogar durch Summation verstärkt (gewöhnlich kurze Krankheitsdauer eines echten Coma hepaticum).

Das grundsätzlich andersartige Verhalten des Index im Präkoma und Coma hepaticum erscheint uns das wesentlichste Ergebnis unserer Untersuchungen.

Die Mittelwertskurven derartiger Fälle (Abb. 2 u. 3) lassen sich maßstabsgerecht mit Abb. 1 vergleichen, und der Unterschied ist schon rein optisch wirklich eindrucksvoll. Dabei stellen wir bewußt

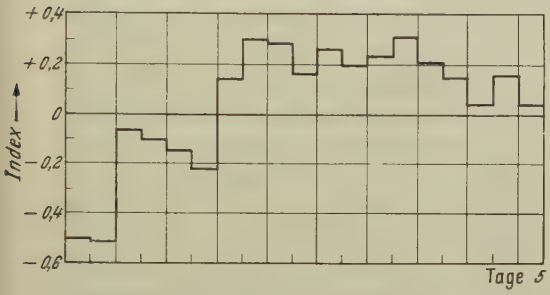


Abb. 2. Indexmittelwertskurve von 7 Hepatitispatienten, welche zu Beginn der Behandlung präkomatös, unter geeigneter Therapie aber innerhalb weniger Tage wieder ansprechbar waren.

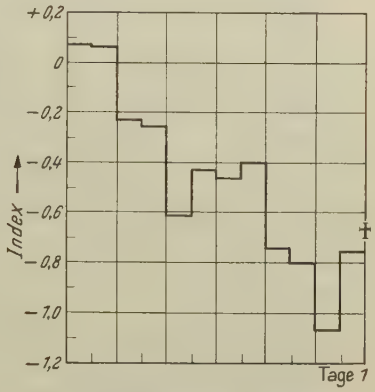


Abb. 3. Indexmittelwertskurve von 12 Fällen von akuter gelber Leberatrophie, welche im Koma verstarben.

diesen „pathologischen" Indices im Präkoma und Coma hepaticum das „normale" Verhalten des Index bei der *unkomplizierten* Hepatitis gegenüber. Es soll damit zum Ausdruck gebracht werden, daß es sich unseres Erachtens bei diesen durch zunehmende Somnolenz, bei gleichzeitiger Wasser- und Natriumretention sowie Kaliumausschüttung — um nur die hier interessierenden Stoffwechselstörungen zu nennen — gekennzeichneten Zuständen um eine echte Komplikation des bestehenden Grundleidens und nicht nur um eine einfache Verschlimmerung desselben handelt. Als Indiz führen wir an, daß es keine Übergangsformen gibt; auch die schwerste Hepatitis mit maximalen Bilirubinwerten von 40 mg% und darüber zeigt bei normalen Wasser- und Elektrolytausscheidungen ein freies Sensorium, ja häufig geradezu ein Wohlbefinden, welches es schwierig macht, die Patienten im Bett zu halten. Dagegen ist der Übergang zur Oligurie mit einem Sinken des Index ein Signum male ominis, wie bereits an anderer Stelle ausgeführt wurde[111]. Umgekehrt verfügen wir über eine Reihe von Beobachtungsfällen, welche präkomatös eingeliefert wurden, oder stationär in einen solchen Zustand gerieten, aus welchen sie noch durch intensive therapeutische Maßnahmen (extra-

durale Spinalanästhesien usw.) zu erwecken waren und bei denen der Index nicht der Schwere des Leberparenchymschadens, sondern der Lebenserwartung parallel ging.

Für die Annahme einer echten „Komplikation", d. h. eines Hinzutretens weiterer, von dem Leberschaden nicht direkt abhängiger Faktoren spricht auch die Beobachtung, daß auch andere allmählich zum Tode führende Leiden — bei denen kein Leberparenchymschaden besteht — ante finem die gleiche Indexdepression wie das Coma hepaticum zeigen können. Zum Beweise führen wir die Indexkurve einer 70jährigen Frau an (Abb. 4), welche an einer Fußgangrän verstarb und hinsichtlich ihrer Nahrungsaufnahme bis zuletzt kaum gestört war. Umgekehrt bot natürlich die Indexkurve einer Patientin, welche im Verlaufe einer sehr schweren Hepatitis schlagartig an einer Lungenembolie verstarb, keinerlei Besonderheiten, obwohl der Urin bis zuletzt gesammelt wurde.

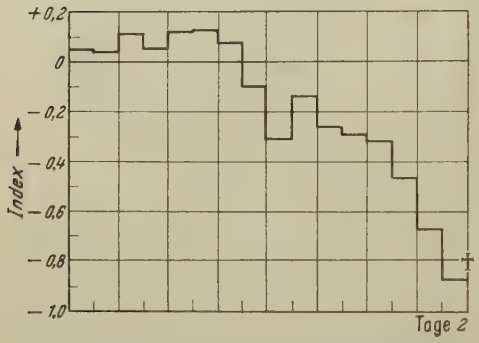


Abb. 4. Indexkurve einer siebzigjährigen Patientin, welche an einer Gangrän verstarb.

Die ungestörte Nahrungsaufnahme ist deshalb besonders zu betonen, weil man vielleicht einwenden könnte, daß ante finem gleichzeitig mit der verringerten Nahrungsaufnahme auch die Natriumzufuhr (und -ausfuhr) abnimmt, während endogenes Kalium aus dem — eventuell sogar vermehrten — Eiweißzerfall weiter zur Ausscheidung gelangt. Demgegenüber ist es wichtig zu betonen, daß bei den Komafällen in der Regel laufend Infusionen (meist halb Kochsalz, halb Traubenzucker) gemacht wurden; die in diesen Fällen nahezu regelmäßig bestehende hochgradige Oligurie bis Anurie ist unter diesen Umständen vollends nicht mehr zu erklären, wenn man nicht das Überwiegen eines natrium- und wasserretinierenden Faktors anerkennen will.

Das Verhalten der Wasserausscheidung und der Elektrolyte im Coma hepaticum zeigt somit eine auffallende Parallele zu dem bei der dekompensierten Lebercirrhose und unterscheidet sich praktisch nur durch die verschiedene Dauer dieses Zustandes. Es ist deshalb nicht von der Hand zu weisen, daß auch der „salt retaining stimulus"[47, 115] der gleiche sein könnte. Seine endgültige Identifizierung muß der zukünftigen Forschung vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung.

Es wird der Nachweis geführt, daß die in der Literatur bei der Hepatitis beschriebenen Elektrolytverschiebungen sich an einem größeren Material statistisch nicht sichern lassen. Dagegen bestehen gesicherte Unterschiede gegenüber dem Coma hepaticum und anderen chronischen zum Tode führenden Leiden, deren mögliche Ursachen diskutiert werden.

Literatur.

[1] Amatuzio, D. S.: J. Labor. a. Clin. Med. **39**, 26 (1952). — [2] Allott, E. N.: Lancet **1**, 1035 (1939). — [3] Ames, R. G., et al.: Endocrinology **46**, 215 (1950). [4] Amelung, D., et al: Klin. Wschr. **31**, 386 (1953). — [5] Bacchus, H.: Amer. J. Physiol. **163**, 326 (1950). — [6] Beckmann, K.: Z. exper. Med. **59**, 76 (1928). — [7] Beckmann, K.: Dtsch. Arch. klin. Med. **160**, 63 (1928). — [8] Beckmann, K.: Dtsch. Arch. klin. Med. **164**, 309 (1929). — [9] Benda, L., u. W. Rissel: Wien. klin. Wschr. **62**, 1 (1950). — [10] Benda, L., et al: Wien. Z. inn. Med. **31**, 177 (1950). — [11] Bongiovanni, A., u. W. J. Eisenmenger: J. Clin. Endocrinology **11**, 152 (1951). — [12] Blahd, W. H., et al: J. Labor. a. Clin. Med. **39**, 393 (1952). — [13] Black, D. A. K., u. A. E. Thomson: Clin. Scie. **10**, 511 (1951). — [14] Buchanan, I. M., et al: J. of Biol. Chem. **180**, 435 (1949). — [15] Baez, S., et al: Amer. J. Physiol. **162**, 198 (1950). — [16] Birnie, J. H.: Fed. Proc. **9**, 12 (1950). — [17] Boylston, G. H., and A. C. Ivy: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **38**, 644 (1938). — [18] Conn, J. W.: J. Clin. Endocrinology **10**, 12 (1950). — [19] Conn, J. W.: Arch. int. Med. **83**, 416 (1949). — [20] Cattell, M., and H. Civin: J. of Biol. Chem. **126**, 633 (1938). — [21] Cooper, I. S., and C. S. MacCarthy: Proc. Staff Meet. Mayo Clin. **26**, 354 (1951). — [22] Cooper, I. S., and P. H. Crevier: J. Clin. Endocrinology **12**, 821 (1952). — [23] Castleden, L. I. M.: Clin. Scie. **3**, 241 (1938). — [24] Comb. Staff Clinic: Amer. J. Med. **9**, 102 (1950). — [25] Cohnheim and Lichtheim: Arch. path. Anat. a. Physiol. **69**, 106 (1877). — [26] Chalmers, T. M., et al: J. of Physiol. **112**, 238 (1951). — [27] Chalmers, T. M., and C. S. Davidson: New. England J. Med. **240**, 449 (1949). — [28] D'Silva, J. L.: J. of Physiol. **90**, 303 (1938). — [29] Duncan, E. L., et al: J. Clin. Invest. 30, 908 (1951). — [30] Dury, A.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **77**, 199 (1951). — [31] Dury, A., and Th. N. Johnston: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **78**, 425 (1951). — [32] Dury, A.: Endocrinology **49**, 663 (1951). — [33] Dury, A., et al: J. Clin. Invest. **31**, 440 (1952). — [34] Dixon, K. C.: Biochemic. J. **44**, 187 (1949). — [35] Dennis, J., and F. J. Mullins: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **38**, 560 (1928). — [36] Darrow, D. C.: Bull. N.Y. Acad. Med. **24**, 147 (1948). — [37] Darrow, D. C.: New England J. Med. **242**, 978 (1950). — [38] Darrow, D. C.: J. Clin. Invest. **27**, 198 (1948). — [39] Drill, V. A., and B. Frame: Fed. Proc. **7**, 215 (1948). — [40] Eisenmenger, W. J., et al: J. Labor. a. Clin. Med. **34**, 1029 (1949). — [41] Eisenmenger, W. J., et al: J. Clin. Invest. **29**, 1491 (1950). — [42] Eisenmenger, W. J., et al: J. Clin. Endocrinology **7**, 264 (1947). — [43] Eisenmenger, W. J.: Ann. Int. Med. **37**, 261 (1952). — [44] Elkinton, J. R., and A. W. Winkler: J. Clin. Invest. **23**, 93 (1944). — [45] Eversole, W. J., et al: Endocrinology **45**, 378 (1949). — [46] Farnsworth, E. B.: Amer. J. Med. **4**, 338 (1948). — [47] Farnsworth, E. B., and J. S. Krakusin: J. Labor. a. Clin. Med. **33**, 1545 (1948). — [48] Farnsworth, E. B., and J. S. Krakusin: J. Labor. a. Clin. Med. **33**, 1534 (1948). — [49] Frost, R. C., and R. V. Talmage: Endocrinology **49**, 606 (1951). — [50] Fenn, W. O., u. R. Gerschmann: J. Gen. Physiol. **33**, 195 (1950). — [51] Frunder, H.: Z. Physiol. Chem. **291**, 217 (1952). — [52] Falono, W. W., et al: J. Clin. Invest. **28**, 595 (1949). — [53] Frawley, T. F., and G. W. Thorn: Proc. 2nd ACTH Conf. **1**, 115 (1951). — [54] Fanconi, G.: Helvet. Paediat. Acta **7**, 309 (1952). — [55] Goodyer, A. V. N., et al: J. Clin. Invest. **29**, 973 (1950). — [56] Greig, M. E., u. W. C. Holland: Arch. Biochem. **23**, 370 (1949). — [57] Gilman, A., u. L. Goodmann: J. Physiol. **90**, 113 (1937). — [58] Gabuzda, G. J., et al: J. Clin. Invest. **29**, 814 (1950). — [59] Green, D. M., et al: Endocrinology **47**, 281 (1950). — [60] Grad, B.: J. Clin. Endocrinology: **12**, 708 (1952). — [61] Glaubach, S., u. H. Molitor: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **132**, 31 (1928). — [62] Glaubach, S., u. H. Molitor: Wien. klin. Wschr. **42**, 1437 (1929). [63] Heni, F.: Z. klin. Med. **139**, 698 (1941). — [64] Harrison, H. E., and D. C. Darrow: Amer. J. Physiol. **125**, 631 (1939). — [65] Harreveld, A. van: J. Cell. Comp. Phy-

siol. **35**, 331 (1950). — [66] Hoagland, C. L.: Bull. N.Y. Acad. Med. **21**, 537 (1945). — [67] Hall, C. A., et al: Endocrinology **44**, 76 (1949). — [68] Heller, H., and F. F. Urban: J. of Physiol. **85**, 502 (1935). — [69] Hashimoto: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **76**, 367 (1914). — [70] Hare, K., et al: Amer. J. Physiol. **134**, 240 (1941). — [71] Ingle, D. C.: Ann. Int. Med. **35**, 652 (1951). — [72] Ingle, D. C., et al: Amer. J. Physiol. **118**, 302 (1937). — [73] Ingram, W. R., et al: Amer. J. Physiol. **127**, 544 (1939). — [74] Kendall, M. G.: The Advanced Theory of Statistics Vol. I, 4th Edit. (1948); Vol. II, 3rd Edit. (1951). London: Ch. Griffin & Co. — [75] Krebs, H. A., et al: Biochemic. J. **48**, 530 (1951). — [76] Kaplan, S. A., and S. Rapoport: Amer. J. Physiol. 164, 175 (1951). — [77] Keys, A.: Amer. J. Physiol. **121**, 325 (1938). — [87] Klein, R.: J. Clin. Invest. **30**, 318 (1951). — [79] Kunkel, H. G.: Amer. J. Med. **9**, 106 (1950). — [80] Leonardo da Vinci: Tratt. della Pitt., fol. 1. — [81] Linder, A.: Statistische Methoden, 2. Aufl. Basel: Verl. Birkhäuser 1951. — [82] Locke, W., et al: J. Clin. Invest. **30**, 325 (1951). — [83] Lewy, F. H., and F. K. Gassmann: Amer. J. Physiol. **112**, 504 (1935). — [84] Lloyd, C. W., and J. Lobotsky: J. Clin. Endocrinology **10**, 318 (1950). — [85] Lloyd, C. W., and R. H. Williams: Amer. J. Med. **4**, 315 (1948). — [86] Lewis, I. M., et al: Circulation **2**, 822 (1950). — [87] Labby, D. H., and C. L. Hoagland: J. Clin. Invest. **26**, 343 (1947). — [88] Leslie, St. H., et al: J. Clin. Invest. **30**, 1200 (1951). — [89] Leaf, A., and A. R. Mamby: J. Clin. Invest. **31**, 60 (1952). — [90] Mudge, G. H.: Amer. J. Physiol. **165**, 113 (1951). — [91] Murphy, R. J. F.: J. Clin. Invest. **29**, 836 (1950). — [92] Nachmansohn, D.: The role of acetylcholine in the mechanism of nerve activity, Vitamins and Hormones; ed. Harris, R. S., and K. V. Thimann: New York Acad. Press **3**, 337 (1945). — [93] Pick, E. P.: J. Mt. Sinai Hosp. **13**, 167 (1946). — [94] Pick, E. P.: The Harvey Lectures, S. 25. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1931, 25. — [95] Pick, E. P.: Verh. Ges. Verdauungskrkht. **125**, 171 (1925). — [96] Ponder, E.: J. Gen. Physiol. **33**, 745 (1950). — [97] Pickford, M.: Physiol. Rev. **25**, 573 (1937). — [98] Patek, A. J. R., et al: J. Clin. Invest. **26**, 1178 (1947). — [99] Ricketts, W. E.: Ann. Int. Med. **34**, 37 (1951). — [100] Richardson, I. H., et al: Amer. J. Physiol. **165**, 93 (1951). — [101] Ralli, E. P., et al: J, Clin. Invest. **24**, 316 (1945). — [102] Simpson, Sylvia, A., and J. F. Tait: Endocrinology **47**, 308 (1950). — [103] Sweet, W. H., et al: The Frontal Lobes. Baltimore: Williams & Wilkins Co. **27**, 795 (1948). — [104] Shanes, A. M.: J. Gen. Physiol. **33**, 643 (1950). — [105] Stevenson, J. A. F., et al: Amer. J. Physiol. **161**, 35 (1950). — [106] Strauss, M. B., et al: J. Clin. Invest. **31**, 80 (1952). — [107] Sims, J. L.: J. Labor. a. Clin. Med. **36**, 990 (1950). — [108] Smith, H. W.: The Kidney. N. Y. Oxford: Univ. Press 1951. — [109] Schönberg, W.-D. v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 358 (1952). — [110] Schönberg, W.-D. v.: Klin. Wschr. **30**, 833 (1952). — [111] Schönberg, W.-D. v.: Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. **58**, 450 (1952). — [112] Schönberg, W.-D. v.: unveröffentlichte Daten. — [113] Selye, H.: Textbook of Endocriniology Acta Endocrin., Montreal (1949). — [114] Sirota, J. H., and I. G. Kroop: J. Clin. Invest. **30**, 1082 (1951). — [115] Snavely, J. R.: Amer. J. Med. Scie. **223**, 96 (1952). — [116] Starling: Amer. J. Physiol. **14** (1893); **16** (1894); **17** (1894); **24** (1899). — [117] Schiller, J., et al: Sem. hôsp., Paris **27**, 2390 (1951). — [118] Tait, J. F.: Lancet **1952**, 122. — [119] Taylor, H. C., et al: Amer. J. Obstetr. **38**, 748 (1939). — [120] Thorn, G. W., and K. Emerson jr.: Ann. Int. Med. **14**, 757 (1940). — [121] Thorn, G. W., and L. L. Engel: J. Exper. Med. **68**, 299 (1938). — [122] Vogt, M.: J. of Physiol. **113**, 129 (1951). — [123] Verney, E. B.: Lancet **2**, 739, 781 (1946). — [124] Verney, E. B.: Proc. Roy. Soc. (Lond.) **135**, 25 (1947). — [125] Weller, J. M.: Ann. Int. Med. **33**, 607 (1950). — [126] White, A. G., et al: J. Clin. Invest. **30**, 1287 (1951). — [127] Warming-Larsen, A., et al: Acta Endocrinology **11**, 400 (1952). — [128] Wollheim, E.: Dtsch. med.Wschr. **76**, 789 (1951).

Dr. W. D. v. Schönberg, I. Med. Abt. d. Allgem. Krankenhauses St. Georg, Hamburg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 351—357 (1953).

Aus der inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Bielefeld
(Chefarzt: Professor Dr. med. H. J. Wolf).

Antiperniciös wirksame Stoffe bei der Bleianämie.

Von
Norbert Gerlich und Rudolf Remy.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Dezember 1952.)

Die Anämie ist eines der charakteristischen Symptome der Bleivergiftung.

Nach Vanotti ist die Ursache der Anämie in einer Störung der Hämoglobinsynthese zu suchen, wobei der Eiseneinbau in den Porphyrinring gehemmt wird. Kanch u. Mitarb. nehmen an, daß die Porphyrinbildung verhindert wird. Teisinger konnte zeigen, daß Erythrocyten in vitro zugeführtes Blei fast vollständig aufnehmen. Das Wiederauswaschen gelingt praktisch nicht. Benkö vermutet eine Schädigung des Knochenmarks. Mit Hilfe der Autohistoradiographie ist von Behrens u. Mitarb. die Bleiverteilung und Bleiablagerung im Organismus eingehend untersucht worden. Blei verhält sich danach wie Calcium, erklärlich durch die Schwerlöslichkeit der Phosphorsäureverbindungen. Diese Befunde wurden bestätigt durch Weyrauch, Necke und Müller. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kehoe, Thamann und Cholak. Die umfassende Beschreibung der Giftwirkung des Bleis findet sich bei Flury. Die Feinverteilung des Bleis im Knochen ist mit Hilfe radioaktiver Isotopen bereits von Behrens und Baumann dargestellt worden. Später hat Schneider diese Untersuchungen bestätigt. Immer kommt es bei der Bleiintoxikation zu einer erhöhten Porphyrinausscheidung im Urin. Diese Porphyrinurie ist nach de Langen und ten Berg nach Ausschluß eines hämolytischen Ikterus, einer perniziösen Anämie, Barbitursäurevergiftung und fieberhaften Erkrankungen ein typisches Zeichen der Bleivergiftung. Brugsch jr. glaubte daher, aus der Größe der Porphyrinausscheidung auf die Schwere der Bleivergiftung schließen zu können. Fildes und Wood nehmen sowohl für das Auftreten der Anämie als auch für die anderen Erscheinungen der Bleivergiftung eine allgemeine Fermentschädigung an. Smith und Hansen erbrachten den Nachweis, daß die Carboxypolypeptidase nicht nur durch Jodacetat, sondern auch durch Kupfer und Blei über eine Komplexbindung an die Sulfhydrilgruppen des Enzyms stark gehemmt wird. Wie Lourau experimentell zeigte, hemmt das Blei bei oraler Zufuhr die Bildung hämatopoetisch wirksamer Faktoren im Magen-Darmkanal. Während Extrakte aus Magenschleimhaut und Leber gesunder Tiere die Anämie bleivergifteter Kaninchen zu bessern vermochten, war das mit Extrakten gleicher Organe bleivergifteter Tiere nicht möglich. Die Autorin zog daraus den Schluß, daß sich Blei und antiperniziös wirksame Leberextrakte antagonistisch verhalten. Sie nimmt an, daß das Ausmaß des Erythrocytenanstiegs und auch des Hämoglobins bei Tieren, die durch Verfütterung von Bleiweiß anämisch und denen nachfolgend antiperniziös wirksame Leberextrakte zugeführt wurden, als Test für deren Wirksamkeit angesehen werden kann. Nach ihrer Meinung ist dieser Effekt spezifisch für Leberextrakte.

Wenn danach aber die hämatopoetische Wirksamkeit von Leberextrakten bestimmt werden kann, war es von Interesse festzustellen, inwieweit dieser Effekt dem Vitamin B_{12}, andererseits aber auch weiteren hämatopoetisch wirksamen Stoffen zukommt. Nachdem Hofmann nachweisen konnte, daß das Eisen die experimentell erzeugte Bleianämie nicht beeinflußt, kamen für unsere Untersuchungen neben reinem Vitamin B_{12} Leberextrakte verschiedenen Gehaltes an B_{12}, Folsäure und Kobalt in Betracht.

Nach den Untersuchungen von Behrens, Weyrauch, Necke und Müller, Aub, Poggato und Antonioli, Cantarow und Trumper, Anderson und Schneider wird oral gegebenes Blei resorbiert und teilweise wieder durch die Galle ausgeschieden. Die Resorption ist abhängig von der Darmfüllung, der Geschwindigkeit der Passage und der Ausscheidung durch die Galle.

Es ist daher nach unseren Beobachtungen für vergleichende Untersuchungen zur Erzielung möglichst einheitlicher Effekte die intravenöse Zufuhr von Blei in Form des Acetats besser geeignet. Bei Versuchstieren gleicher Rasse und gleichen Gewichtes liegt das Ausmaß der Anämie in Abhängigkeit von der Bleidosis in engen Grenzen. Wir wählten bei unseren Versuchen als Kriterium der Wirksamkeit der verschiedenen Stoffe allerdings zunächst nicht das mehr oder weniger starke Ansteigen der Erythrocyten- und Hämoglobinwerte nach Injektion der hämatopoetisch wirksamen Substanzen bei bereits eingetretener Anämie, sondern die Verzögerung des Abfalls der Blutwerte bei gleichzeitiger Injektion von Wirkstoff und Blei (Gerlich).

Injiziert man 2—3 kg schweren männlichen Kaninchen täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen 5,5 mg Bleiacetat/kg Körpergewicht intravenös, so kommt es zu einem ziemlich gleichmäßigen Abfall der Hämoglobin- und Erythrocytenwerte. Der Tiefpunkt mit durchschnittlich 2,5 Mill. Erythrocyten und etwa 50% Hämoglobin wird etwa am 5. Tage erreicht (Abb. 1). In den folgenden drei Wochen bleiben diese Werte praktisch konstant und beginnen hernach langsam spontan anzusteigen (Gerlich). Das Ausmaß der Anämie, die Dauer ihres Bestehens und die Geschwindigkeit des Wiederanstiegs der Blutwerte ist nicht nur von der verabfolgten Bleidosis, sondern auch von Alter, Gewicht, Geschlecht und Rasse der Tiere abhängig.

Injizierten wir zusätzlich an den gleichen Tagen Leberextrakte, so konnte der Eintritt der Anämie deutlich verzögert werden. Aus der Abb. 1 geht hervor, daß dieser Effekt in bestimmten Grenzen von der Dosierung des Leberextraktes abhängt. Gaben wir 1 cm^3/kg eines auf das fünffache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten, nicht mit Vitamin B_{12} angereicherten Leberextraktes (HEPATRAT), so wurde während der Beobachtungszeit von 6 Tagen nur ein ganz geringfügiger Abfall der Erythrocyten festgestellt. Die Hämoglobinwerte hingegen sanken lang-

sam um etwa 2,8 g% ab, weit weniger jedoch als bei den Tieren, die lediglich Blei erhielten. Bei einer Verdünnung des gleichen Leberextraktes von 1:7 konnte das Ausmaß der Anämie vermindert werden. Die zugeführte Menge reichte jedoch nicht aus, die Erythrocytenzahl auf dem Ausgangswert zu halten. Bei weiterer Kontrolle der Blutbefunde in den folgenden Tagen sanken auch bei den mit Leber behandelten Tieren die Hämoglobin- und Erythrocytenzahlen auf die gleichen Werte ab, wie sie nach alleiniger Bleivergiftung bereits nach 5 Tagen erhalten wurden.

Da in den antiperniziös wirksamen Leberextrakten das Vitamin B_{12} als wesentlichster Wirkstoff anzusehen ist, galt es zu untersuchen, ob diese, die Bleianämie verhütende Wirkung, dem B_{12} zukommt. Tatsächlich läßt sich durch gleichzeitige Gaben von B_{12} der Eintritt der Anämie aufhalten (Abb. 1). Auch hier ist der Effekt wieder dosenabhängig. Durch 5γ Vitamin B_{12} wird das Absinken der Hämoglobin- und Erythrocytenwerte in gleicher Weise aufgehalten wie durch den Leberextrakt in einer Verdünnung 1:5 und durch $2{,}5\gamma$ B_{12} wie durch die Verdünnung 1:7.

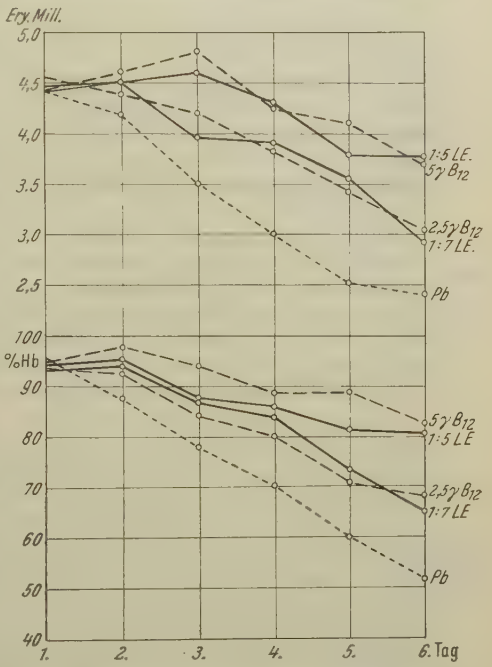


Abb. 1. Vergleich der Wirkungen verschiedener Dosen von Leberextrakten und B_{12} bei gleichzeitiger intravenöser Bleigabe. Durchschnittswerte von je 9 männlichen Kaninchen.

Die Bestimmung des Vitamin B_{12}-Gehaltes in den Leberextrakten erfolgt im allgemeinen mit Hilfe mikrobiologischer Methoden. Eine solche Methode ist angegeben in der USP. IX. Als Testkeim ist da der Lactobacillus Leichmannii vorgeschrieben (siehe auch Hoffmann u. Mitarb.).

Außer dem Lactobacillus Leichmannii läßt sich auch der Lactobacillus Dorner (Shorb) für die B_{12}-Bestimmung verwenden. Heinrich sowie Heinrich und Lahann, Lens, Wijmenga, Wolff, Karlin, Winkler und de Haan beschrieben colorimetrische bzw. spektrophotometrische Methoden, mit denen es gelingt, in Leberpräparaten den Vitamin B_{12}-Gehalt festzustellen. Die dabei ermittelten Werte stimmen mit denen, wie sie bei der mikrobiologischen Testung gefunden werden, überein.

1 cm³ des von uns benutzten Leberextraktes (HEPATRAT) enthält 6γ B_{12}; mit der Verdünnung 1:5 wurden demnach also nur $1{,}2\gamma$ B_{12} zugeführt. Es zeigt sich somit, daß der gleiche, den Eintritt der Bleianämie

verhütende Effekt wie durch Zufuhr von 5γ reinem B_{12} durch Leberextrakt mit nur 1,2γ erzielt werden kann. Es liegt also in diesem Falle ein Wirkungsverhältnis von 1:4,1, beim Vergleich der geringeren Dosierungen ein solches von 1:3 vor.

In gleicher Weise verglichen wir auch noch andere handelsübliche, nicht mit Vitamin B_{12} angereicherte Leberextrakte. Das Verhältnis der Wirksamkeit gegenüber reinem B_{12} lag zwischen 1:3 und 1:4.

Diese Befunde entsprechen denen von van Klaweren, der mit einer nach unserem Verfahren modifizierten Methode arbeitete und ein Verhältnis von 1,6:2,35 bzw. 1,6:4,3 ermittelte, wie wir einer persönlichen Mitteilung entnehmen. Auch Fischer kam bei Untersuchungen an milchanämischen Ratten zu ähnlichen Ergebnissen. Wie wir aus ihren Kurven errechnen, verhält sich der Hämoglobin- und Erythrocytenanstieg nach B_{12}-und Leberextraktgaben (sie verwandte HEPAHORM mit einem Gehalt von 2γ B_{12}/cm³) wie 1:2,5. An der Eiweißmangelanämie der Ratte erhoben Dumazert und Vermeulen ähnliche Befunde.

Diese experimentellen Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit klinischen Beobachtungen. Jacobsen und Bishop zeigten, daß die Wirkung von Gesamtleberextrakten etwa doppelt so groß ist wie von reinem Vitamin B_{12}, wenn man den B_{12}-Gehalt des Leberextraktes zugrunde legt. Sie nahmen an, daß in der Leber neben dem Vitamin B_{12} noch andere, bei der perinizösen Anämie allein unwirksame Stoffe, wie z. B. l-Tyrosin, Tryptophan, Guanosin, Xantopterin und gewisse Peptide enthalten sind, die die Vitamin B_{12}-Wirkung verstärken.

Weygand, Wacker und Büchmann vermuten, daß auch den in den Leberextrakten vorhandenen Desoxyribosiden ein gewisser hämatopoetischer Effekt zukommt. Bei leichter Erhöhung der Retikulocytenzahl war bei der perniziösen Anämie jedoch kein eindeutiger Effekt auf Hämoglobin und Erythrocyten festzustellen. An Ratten, die durch Eiweißmangelernährung anämisch gemacht wurden, zeigten Ashkenasy und Pariente die Überlegenheit von Leberextrakten über das Vitamin B_{12}. Sie schließen ebenfalls auf das Vorhandensein weiterer Wirkstoffe in Leberextrakten. Hierfür spricht auch, daß nach Owren, Larsen und Beard gelegentlich bei megaloblastischen Anämien unter der Behandlung mit reinem B_{12} Rückfälle zur Makrocytose vorkommen. Wills fand bei der Leberaufarbeitung, daß nach Ausfällung des B_{12} der Überstand einen Faktor enthielt, der besonders bei den tropischen Anämien wirksam ist. Hausmann und Mulli schließen auf einen Kobalt-enthaltenden Wirkstoff. Van Klaweren konnte mit einem „hochgereinigten, nicht B_{12}-haltigen Leberkonzentrat" auch bei der Bleianämie gute Wirkungen beobachten.

Da bei der perniziösen Anämie aber auch die Folsäure wirksam sein kann, untersuchten wir ihre Wirksamkeit auf die Bleianämie. Hesse hatte bereits zeigen können, daß durch große Gaben von Folsäure die Dosis letalis von Bleiweiß für das Kaninchen wesentlich erhöht wird. Wir injizierten nun den Tieren wieder zusammen mit dem Bleiacetat an drei aufeinanderfolgenden Tagen verhältnismäßig große Dosen, nämlich 15 bzw. 30 mg/kg Folsäure (Abb. 2). 15 mg können das Absinken der Erythrocyten und des Hämoglobins kaum aufhalten. Durch 30 mg wird wenigstens für die Zeit der Injektionen, also der ersten drei Tage, der Erythrocytenabfall verhindert, während die Hämoglobinwerte bereits

absinken. Das Absetzen der Injektionen (4. Tag) bewirkt nun einen raschen Abfall der Blutwerte, die bereits am 6. Tage diejenigen bei alleiniger Bleivergiftung erreichen.

Die Bleianämie des Kaninchens läßt sich danach nur durch große Dosen Folsäure, und zwar lediglich für die Zeit ihrer Zufuhr, wenigstens teilweise aufhalten. Dieser Folsäureeffekt spielt bei der Wirkung der Leberextrakte auf die Bleianämie praktisch keine Rolle, da der Gehalt der Leberextrakte an Folsäure viel zu gering ist.

Es war nun lediglich noch die Frage zu klären, ob der die Anämie verhütende Effekt von Leberextrakten und B_{12} nicht durch deren Gehalt an Kobalt bedingt ist, da Rickes u. Mitarb., Smith und Addial den Kobaltgehalt des Vitamin B_{12} mit immerhin 4% angeben.

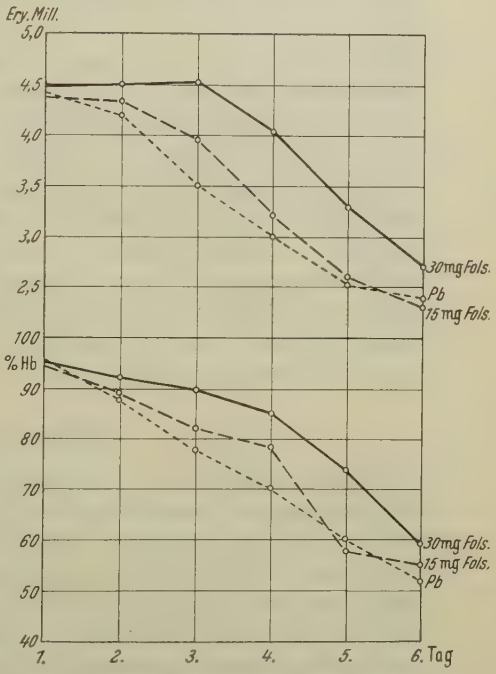


Abb. 2. Wirkung verschiedener Dosen von Folsäure bei gleichzeitiger Gabe von Bleiacetat. Durchschnittswerte von je 9 männlichen Kaninchen.

Wenn Kobalt auch nicht bei der perniziösen Anämie wirkt, so kommt ihm nach Weissbecker, Wolff, Berk, Burchenal und Castle u. a. ein guter Effekt auf zahlreiche andere Anämieformen zu. Im Tierexperiment steigen Hämoglobin und Erythrocyten bis zur Polyglobulie bei Zunahme des erythropoetischen Knochenmarkanteiles an. Die Wirkung soll nach Weissbecker auf einem fermentativen Reiz für die erythropoetischen Zellen durch Anoxämie des Marks beruhen, wie auch Fischer bei der Milchanämie von Ratten bei Kobaltzufuhr im Knochenmark einen Anstieg der erythropoetischen Zellen von 28 auf 47% beobachten konnte. Reines Vitamin B_{12} dagegen führte zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Markzusammensetzung, da dessen therapeutischer Effekt auf der Steigerung der Zellreifung durch verstärkten Aufbau von Kernsubstanzen beruht.

Wir injizierten zusammen mit dem Bleiacetat an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine dem Gehalt des B_{12} an Kobalt entsprechende Kobaltchloridmenge (0,02γ $Co^{\cdot\cdot}$). Irgendein Effekt des Kobalts wurde nicht beobachtet. Die Kurven verliefen praktisch so, wie nach alleiniger Bleiinjektion. Auch die bei der Bleivergiftung bereits eingetretene Anämie reagierte selbst auf über längere Zeit wiederholte Injektionen dieser Kobaltdosis nicht. Es ist daher sicher, daß der Effekt des Vitamin B_{12} und

der Leberextrakte auf die Bleianämie nicht schlechthin durch deren Kobaltgehalt bedingt sein kann.

Erhöhten wir die Kobaltdosis auf 0,08 mg/kg, so war ein deutlicher Einfluß auf die Bleianämie zu beobachten. Auf 3 Injektionen hin kam es am dritten Tage zu einem Anstieg von Hämoglobin und Erythrocyten, dessen Maximum am 5. Tage nach Beginn der Kobaltapplikation lag. Die Erythrocytenwerte stiegen von 2,4 auf 4 Mill. und das Hämoglobin von 45 auf 70% an. 4 Tage lang blieben diese Werte gleich hoch und sanken dann allmählich wieder ab. Es ist dies eine Beobachtung, wie wir sie auch nach Leber- und Vitamin B_{12}-Gaben machten, wenn an drei aufeinanderfolgenden Tagen die eingangs erwähnte optimale Dosis an B_{12} bzw. Leberextrakt gegeben wird. Der Unterschied besteht jedoch darin, daß bei B_{12} und Leberextrakt der Erythrocytenanstieg rasch erfolgt, langsam hingegen der des Hämoglobins. Das entspricht auch den allgemeinen Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus dieser hämatopoetisch wirksamen Substanzen. Kobaltverbindungen entfalten sowohl eine Reizwirkung auf das erythropoetische Knochenmark als auch unter bestimmten Bedingungen einen mobilisierenden Effekt auf die Eisendepots, während durch Leberextrakte und Vitamin B_{12} lediglich die gehemmte Erythropoese aktiviert wird.

Zusammenfassung.

Bei Kaninchen, die durch intravenöse Injektionen von Bleiacetat vergiftet werden, kommt es zum Auftreten einer Anämie. Durch gleichzeitige Gabe von Vitamin B_{12} und Leberextrakten läßt sich der Eintritt der Anämie verzögern. Beim Vergleich der Wirkungen ergibt sich, daß Leberextrakte entsprechend ihrem Gehalt an Vitamin B_{12} drei- bis viermal wirksamer sind als reines B_{12}. Folsäure hat einen weitaus geringeren und auch nur kürzer dauernden Effekt. Kobalt bessert zwar in größeren Dosen die Bleianämie, die im Vitamin B_{12} enthaltenen Mengen jedoch sind nicht wirksam.

Literatur.

Addial: Merck Rep. **1948**, 10. — Anderson: Biochem. Z. **39**, 58 (1945). — Ashkenasy, A., and Pariente: C.r. Acad. Sci. **230**, 2339 (1950). — Aub: J. Amer. Med. Assoc. **104**, 87 (1935). — Behrens: 45. Kongreß Wiesbaden 1933, Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1933**, 333. — Behrens u. Baumann: Z. exper. Med. **92**, 251 (1933). — Benkö: Magy. orv. Arch. **44**, 293 (1943). — Berk, Burchenal and Castle: New England J. Med. **240**, 754 (1949). - Brugsch, jr.: Intern. Kongreß Wiesbaden u. Tag. Dt. Hämatol. Wiesbaden 1952. — Cantarow and Trumper: Lead Poisoning, Baltimore 1944. — De Langen u. ten Berg: Acta med. scand. (Stockh.) **130**, 37 (1948). - Dumazert et Vermeulen: C. r. Soc. Biol. Paris **144**, 1535 (1950). — Fildes: Brit. J. Exper. Path., **67** (1940). — Fischer: Arch. klin. Med. (ersch. demnächst). — Flury: Blei. Hdb. Heffter **3/3**, 1575 (1934). — Gerlich: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 90 (1950). — Hausmann u. Mulli: Nordwest-

deutscher Internistenkongr., Hamburg 1950. — Heinrich: Z. anal. Chem. **135**, 251 (1952). — Heinrich u. Lahann: Z. Naturforsch. **7b**, 417 (1952). — Hesse u. Flöter: Klin. Wschr. **1951** I, 232. — Hoffmann, Stockstad, Hutchings, Dornbush and Jukes: J. of Biol. Chem. **181**, 635 (1949). — Hofmann: Persönliche Mitteilung. — Jacobsen u. Bishop: J. Clin. Invest. **28**, 791 (1949). — Kanch, c. s.: Biochemic. J. **36**, 384 (1942). — Kehoe, Thamann and Cholak: J. Ind. Hyg. **15**, 257, 273, 290, 301, 306 (1933). — Lens, Wijmenga, Wolff, Karlin, Winkler u. de Haan: Biochim. Biophys. Acta **8**, 56 (1952). — Lourau: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **25**, 393 (1943); **29**, 34, 44 (1947). — Owren, Larsen and Beard: Lancet **1950**, 407. — Proc. Int. Kongreß Haematol. Cambridge 1950. — Poggati u. Antonioli: Med. lavoro **31**, 14 (1940). — Rickes, c. s.: Science **1948**, 396. — Schneider: Rev. quin. Pharm. **31**, 9 (1945). — Shorb: Science **107**, 397 (1948). — Smith: Nature (Lond.) **161**, 638 (1948). — Teisinger: Čas. lék. česk. **1934**, 864. — van Klaweren: Persönliche Mitteilung. — Vanotti: Porphyrin u. Porphyrinkrankh. Berlin: Springer 1937. — Weissbecker: Kobalt als Spurenelement u. Pharmakon. Stuttgart: Wissenschaftl. Verl.-Ges. 1950. — Weygand, Wacker u. Büchmann: Klin. Wschr. **1951** II, 429. — Weyrauch, Necke u. Müller: Z. Hyg. **116**, 28 (1934). — Wills: Biochemic. J. **31**, 2136 (1937). — Wolff: Klin. Wschr. **1950** I, 279. — Wood: Brit. J. Exper. Path. **74** (1940).

Dr. med. N. Gerlich, Städt. Krankenhaus, Bielefeld.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 358—364 (1953).

Aus dem Hauplaboratorium der Schering A.G., Berlin (West).

Über protrahiert wirksame Östrogene.

Von

KARL JUNKMANN*.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 9. Juni 1953.)

Vor einiger Zeit konnte ich über protrahiert wirksame Androgene berichten. Ebenso wie bei den Androgenen besteht bei den Östrogenen ein klinisches Bedürfnis nach protrahiert wirksamen Präparaten. Die bisherigen Lösungsversuche dieses Problems wurden in der erwähnten Arbeit kurz zusammengefaßt, so daß ich hier nur auf die dort zusammengestellte Literatur zu verweisen brauche. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß der Veresterung mit verschiedenen Fettsäuren an einer Reihe natürlicher und künstlicher Östrogene auf Ausmaß und Dauer der Wirkung untersucht.

Versuchsanordnung. Die Versuche wurden an weiblichen, weißen Ratten im Gewicht von 80—120 g, gelegentlich auch bis 150 g durchgeführt. Die Tiere wurden in Äthernarkose kastriert und grundsätzlich eine Woche nach der Kastration in den Versuch eingestellt. Sie erhielten die zu prüfenden Östrogene in einer einmaligen Injektion, in 0,1—0,2 cm^3 Sesamöl gelöst, subcutan. Die verwandten Gaben waren jeweils 0,1, 1,0, 10, 100 und 1000 γ/Tier. Für jede Dosierung wurden in der Regel 5 Tiere eingesetzt. Der Scheidenabstrich wurde täglich, bei längerer Dauer der Versuche 2mal wöchentlich kontrolliert und festgestellt, ob die Tiere im Diöstrus oder in irgendeiner Phase des Östrus waren. Als Östrusdauer nach einer bestimmten östrogenen Dosis wurde diejenige Anzahl von Tagen angenommen, in der mindestens 50% der Tiergruppe Proöstrus, Vollöstrus oder Metöstrus zeigten bzw. weniger als 50% der Tiere im Diöstrus waren.

Um ein gewisses Maß für die Wirkungsintensität der einzelnen östrogenen Gaben zu erhalten, wurden bei den uns besonders interessierenden Östradiol-17β-Estern in Abständen von 1 Woche oder 2 Wochen jeweils Tiergruppen von 5 Tieren durch Chloroforminhalation getötet und das Gewicht des Uterus bestimmt. Dazu wurde der Uterus mit Inhalt sauber herauspräpariert und frisch gewogen, das Gewicht auf 100 g Ratte berechnet und der Berechnung des Mittelwerts für die jeweilige Tiergruppe zugrunde gelegt.

* Die Synthese der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen wurde im Laboratorium Dr. Schenk von den Herren Dr. HELMER RICHTER, Dr. OTTO ENGELFRIED und Frau Dr. CHRISTEL LOEWE sowie im Hormonbetrieb Dr. Leckzik von Herrn Dr. EUGEN GRIEBSCH durchgeführt. Ein Teil der Versuche wurde von Fräulein BARBARA KEIL im Rahmen ihrer Arbeiten für eine an der Universität Tübingen einzureichende Dissertation durchgeführt. An den übrigen Versuchen war Fräulein MARGARETHE ARNDT maßgeblich beteiligt.

Versuchsergebnisse. Die Ergebnisse der Untersuchung sind den nachstehenden Tab. 1 und 2 zu entnehmen. Die Tab. 1 gibt die Dauer des Östrus nach einer einmaligen Injektion abgestufter Dosen der

Tabelle 1.

Präparat	F. unkorr. °	Östrusdauer nach einmaliger subcutaner Gabe von x γ in Sesamöl in Tagen				
		1000 γ	100 γ	10 γ	1 γ	0,1 γ
Östradiol-17β-n-butyrat	165,0—167,0	30	17	10	7	5
Östradiol-17β-n-valerianat	145,0—147,0	48	37	17	7	4
Östradiol-17β-i-valerianat	161,0—163,0	45	31	18	9	3
Östradiol-17β-n-capronat	126,5—128,0	48	33	18	6	—
Östradiol-17β-n-önanthat	96,0— 98,0	70	70	40	9	3
Östradiol-17β-n-caprylat	115,0—118,5	63	53	32	5	0
Östradiol-17β-n-undecylat	103,0—106,5	70	70	49	0	0
Östradiol-3-acetat	139,6—141,0	16	5	3	2	0
Östradiol-3-propionat	123,0—124,0	10	5	3	2	1
Östradiol-3-n-palmitat	70,0— 71,0	80	66	12	10	0
Östradiol-3-benzoat	190,0—195,0	32	10	7	3	3
Östradiol-3-benzoat-17β-önanthat	100,0—103,0			0	0	0
Östradiol-3, 17β-di-n-butyrat	63,5— 65,5	48	43	35	9	0
Östradiol-3, 17β-di-n-valerianat	50,0 —52,0	66	48	9	0	0
Östradiol-3, 17β-di-n-capronat	fl.		65	16	0	0
Östradiol-3, 17β-di-n-caprylat	31,5— 33,5	70	103	3	0	0
Östradiol-3, 17β-di-n-undecylat	46,5— 49,0	70	65	7	0	0
Östron-3-acetat	125,0—126,0	12	4	4	4	0
Östron-3-propionat	132,0—134,0	10	5	4	3	0
Östron-3-n-butyrat	103,0—105,0	6	4	3	3	0
Östron-3-n-valerianat	103,0—105,0	8	7	6	3	0
Östron-3-n-capronat	93,5— 96,0	10	7	6	5	0
Östron-3-n-önanthat	64,0— 65,5	27	15	9	5	0
Östron-17-oxim	240,0—243,0	5	0	0	0	0
Östron-3-butyrat-17-oximbutyrat	116,0—120,0	5	0	0	0	0
17α-Äthinyl-östradiol-3-acetat	148,5—149,0		6	4	2	1
17α-Äthinyl-östradiol-3-propionat	123,0—125,0		8	4	3	2
17α-Äthinyl-östradiol-3-n-butyrat	77,0— 78,0		7	4	3	3
17α-Äthinyl-östradiol-3-n-valerianat	98,0—99,0		10	5	4	3
17α-Äthinyl-östradiol-3-n-capronat	71,0— 72,0		11	10	6	4
17α-Äthinyl-östradiol-3-n-önanthat	67,0— 68,0		23	19	6	2
17α-Äthinyl-östradiol-3-n-caprylat	57,0— 58,0		36	27	11	0
Diäthylstilböstrol-di-n-capronat	74,0— 76,0		96	5	0	0
Diäthylstilböstrol-di-n-önanthat	56,0— 59,0		75	5	0	0
Diäthylstilböstrol-di-n-caprylat	59,0— 61,0		106	5	0	0
Dihydrodiäthylstilböstrol-di-n-capronat	95,0— 97,0		65	0	0	0
Dihydrodiäthylstilböstrol-di-n-önanthat	78,0— 81,0		82	0	0	0
Dihydrodiäthylstilböstrol-di-n-caprylat	76,0— 78,0		70	0	0	0

verschiedenen östrogenen Ester wieder. Die Östrusdauer ist ein Maß dafür, wie lange nach einer einzelnen Injektion ein wirksamer, minimaler Östrogenspiegel von einigen Hundertsteln γ aufrechterhalten wird. Trotz der

Tabelle 2.

Östradiol-	Einmalige subcutane Gabe je Tier γ	mg Uterus je 100 g Ratte x Wochen nach der Injektion												
		0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-3-benzoat	1000		817	350		200		106						
-17β-n-butyrat . .			673	321		131		138		72		92		
-17β-n-valerianat .			600	499		366		157		164		145		79
-17-β-i-valerianat .				320		200		200						
-17β-n-capronat .			533	400	283	187	225	179	166	188	139	139	174	
-17β-n-önanthat .			733	625		290		307		287		177		
-17β-n-caprylat . .			359	476	420	414	303	251	251	178	133	153		
-17β-n-undecylat .			371	312	221	229	294	257	306	253	295	176		
-3-benzoat	100		281	125		76								
-17β-n-butyrat . .			673	170		70		67						
-17β-n-valerianat .			542	250		227		133		102				
-17β-i-valerianat .				230		150		115						
-17β-n-capronat. .			337	177	149	151	171	116	107	82				
-17β-n-önanthat .			489	495		280		240		156		130		
-17β-n-caprylat . .			317	266	243	189	181	170		127				
-17β-n-undecylat .			198	243	242	215	246	182			143		135	
-3-benzoat	10		112	90	80									
-17β-n-butyrat . .			237	80		62								
-17β-n-valerianat .			245	149		140		65						
-17β-i-valerianat .				170		105		80						
-17β-n-capronat. .		329	180	140	116	89	70							
-17β-n-önanthat .			246	210		123		125						
-17β-n-caprylat . .		372	196	172	143	135	105							
-17β-n-undecylat .		228	132	152	142	129	129							
-3-benzoat	1	149	111	79										
-17β-n-butyrat . .			136	65		40								
-17β-n-valerianat .			155	82		60								
-17-β-valerianat . .				100		60								
-17β-n-capronat. .		134	122	70										
-17β-n-önanthat .			157	102		78								
-17β-n-caprylat . .		105	74	81										
-17β-n-undecylat .		58	55	74										
Unbeh. Kontrollen	0		51	43		41		33						

relativ großen Streuung, auch der Mittelwerte, die sich besonders störend bei sehr lange dauernden Versuchen mit hohen Dosen bemerkbar macht (dabei treten bekanntlich öfter septische Endometritiden auf, die zum Ausfall von Versuchstieren führen können), läßt sich aus den Zahlenwerten doch folgendes mit ziemlicher Sicherheit ablesen:

Veresterung der Östrogene mit Fettsäuren steigender Kettenlänge führt zu einer Verlängerung ihrer Wirksamkeit, die bei weiterem Ansteigen der C-Zahlen der Fettsäuren wiederum abnimmt und schließlich dazu führt, daß bei einer bestimmten Dosis Ester mit den höheren Fettsäuren unterschwellig und damit unwirksam werden. Dies ist deutlich bei der Dosierung von 0,1 und 1 γ der Östradiol-17β-ester, noch deutlicher bei den Di-Estern des Östradiols, bei denen vom Valerianat aufwärts erst das 100fache der Schwellendosis des freien Östradiols wirksam ist. Letzteres gilt auch für die Di-Ester der synthetischen Ersatzöstrogene wie Diäthylstilböstrol und Dihydrodiäthylstilböstrol mit Capronsäure, Önanthsäure und Caprylsäure, wobei bei den letzteren erst etwa ein 1000faches der Schwellendosis des unveresterten Präparates die untere Grenze der Wirksamkeit darstellt.

Obwohl die entsprechenden höheren Fettsäuren nicht mit untersucht wurden, ist mit großer Wahrscheinlichkeit vorauszusehen, daß die Fortsetzung der Esterreihe bis zu den Estern dieser Säuren auch bei den höheren Dosierungen von 100 und 1000 γ schließlich zur Wiederabnahme der Östrusdauer bzw. zur Unwirksamkeit führen wird.

Allgemein fällt auf, daß jeweils die Verzehnfachung der Dosis nur eine relativ geringfügige Erhöhung der Wirkungsdauer zur Folge hat, die in grober Näherung etwa dem Logarithmus der Dosis proportional geht; mit anderen Worten: Die Wirkungsausbeute hinsichtlich Östrusdauer ist relativ unökonomisch. So wird mit dem 100—200fachen der östrogenen Schwellendosis etwa beim Östradiolvalerianat nur eine Wirkungsdauer von 17 Tagen erreicht, während man in unterteilter Dosis mit täglich 0,05γ Östradiol eine Wirkung über 200 Tage hätte auslösen können. Analoge Überlegungen können mit demselben Ergebnis auch bei den übrigen untersuchten Verbindungen bei allen angewandten Dosierungen angestellt werden.

Weitere Aufschlüsse vermitteln die nach einmaligen Gaben von 1000, 100, 10 bzw. 1 γ in verschiedenen Zeitabständen nach der östrogenen Injektion festgestellten Uterusgewichte im Vergleich zur Wirksamkeit des Östradiol-3-benzoats als des bisher am häufigsten klinisch benutzten Östrogens, wie sie in Tab. 2 zusammengestellt sind.

Als wirksamster Ester imponiert hier — ebenso wie bei den seinerzeit beschriebenen Androgenen — das Önanthat. Während in der ersten Woche nach der Injektion diese Überlegenheit des Önanthats durch die wechselnd starke Sekretfüllung des Uterus bei den verschiedenen östrogenen Estern nicht ganz so sicher zum Ausdruck kommt, ist sie in der 2.—4. Woche deutlich ausgesprochen. Im weiteren Verlauf verschieben sich die Verhältnisse zugunsten der höheren Ester mit Caprylsäure und Undecansäure infolge des sehr viel langsameren Abklingens der Wirkung dieser letzteren beiden Ester. Es liegen also hinsichtlich Wirkungs-

intensität und -dauer auch bei den östrogenen Estern analoge Verhältnisse wie bei den androgenen Estern vor. Mit zunehmender Länge der veresternden Fettsäure steigt die Wirkungsintensität zu einem Optimum beim Önanthsäureester an, während die Wirkungsdauer bei abnehmender

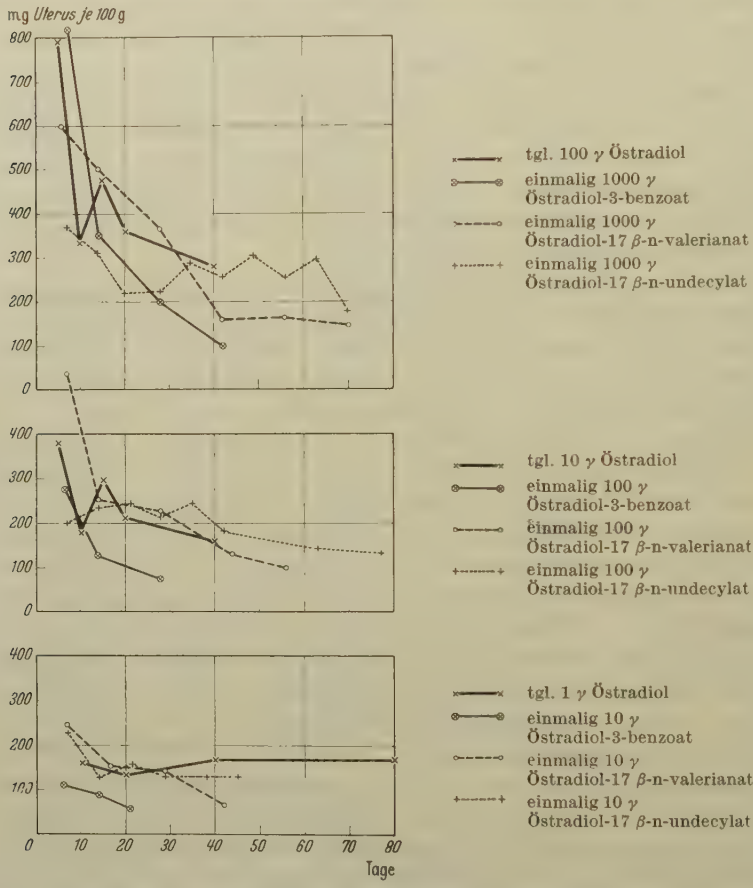


Abb. 1. Vergleich der Wirksamkeit einiger Östradiolester bei einmaliger Injektion verschiedener Dosen mit der Wirkung der täglichen Injektion abgestufter Gaben von freiem Östradiol.

Wirkungsintensität mit weiter zunehmender Länge der Fettsäureketten auch über dieses Optimum der Wirkungsintensität hinaus weiter zunimmt.

In der Abbildung habe ich nun die Wirkung der einmaligen Injektion von 1000, 100 oder 10 γ Östradiol-3-benzoat, Östradiol-17β-n-valerianat und Östradiol-17β-n-undecylat auf das Uterusgewicht der Wirkung der täglichen Injektion von 100, 10 oder 1 γ freien Östradiols gegenübergestellt.

Aus dieser Zusammenstellung möchte ich folgendes ablesen:

Bei einer Dosierung von einmal 1000 γ entspricht die Wirkung des Östradiol-3-benzoats höchstens während 14 Tagen etwa der Wirkung der täglichen Injektion von 100 γ Östradiol, um dann stark hinter der Wirksamkeit der chronischen Behandlung zurückzubleiben. Die einmalige Gabe von Östradiol-17β-n-valerianat wirkt zwar vielleicht in der ersten Woche nicht ganz so stark wie die tägliche Behandlung mit 100 γ freiem Östradiol. Sie ist dieser chronischen Behandlung jedoch bis zum 31. Tag deutlich überlegen. Im weiteren Verlauf bis zum 70. Tag ist sie dagegen weniger wirksam. Bis zum 31. Behandlungstag wirken demnach einmal verabreichte 1000 γ Östradiol-17β-n-valerianat etwa ebenso wie eine tägliche Behandlung mit 100 γ freiem Östradiol, d. h. eine Gesamtdosis von 3100 γ freiem Östradiol ist während 31 Tagen äquivalent einer einmaligen Gabe von 1000 γ Östradiol-17β-n-valerianat, in der nur 765 γ Östradiol enthalten sind. Es wird also bei einmaliger Injektion einer Menge Östradiol in Form des Valerianats hinsichtlich des Uterusgewichts der gleiche Effekt erreicht, wie mit der 4fachen Menge freien Östradiols bei Verteilung der Gesamtdosis auf tägliche Einzelinjektionen.

Die Wirkung von 1000 γ Östradiol-17β-n-undecylat bleibt während der ersten 35 Tage deutlich hinter der Wirkung der täglichen Injektion von 100 γ freien Östradiols zurück, um sich anschließend während des Verlaufs von weiteren 35 Tagen etwa im Niveau der Wirkung einer täglichen Injektion von 100 γ Östradiol zu halten. Für die Hälfte von 70 Tagen erscheint demnach auch die Wirkung von 1000 γ Östradiol-17β-n-undecylat der Wirkung der täglichen Injektion von 100 γ freien Östradiols äquivalent. Dies entspricht, selbst wenn man die Unterwertigkeit der einmaligen Behandlung während der ersten 35 Tage des Versuches gegenüber der chronischen Behandlung mit in Rechnung stellt, immer noch einer recht beachtlichen Wirkungsausbeute. Zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Wirkungsausbeute kommt man, wenn man die Kurven nach einmaliger Verabreichung von 100 oder 10 γ unserer 3 als Beispiele gewählten Ester mit der Wirkung der täglichen Injektion von 10 bzw. 1 γ Östradiol vergleicht. Ebenso könnten Vergleiche der Wirksamkeit der übrigen Östradiol-17-ester mit der Wirkung der chronischen Östradiol-Behandlung angestellt werden, wobei sich ergäbe, daß die Ester der Valeriansäure, Capronsäure, Önanthsäure und Caprylsäure eine besonders ökonomische Darreichungsform des Östradiols darstellen, indem sie mit kleinsten Mengen von Wirkstoff eine je nach der Dosis verschieden lange anhaltende Wirkung auf das Wachstum des weiblichen Genitales auslösen, wie sie erst durch ein Mehrfaches dieser Gaben bei täglicher Verabfolgung in unterteilter Dosis von freiem Östradiol erhalten werden. Diese Ester erwiesen sich somit in dieser Beziehung auch dem altgewohnten Östradiol-3-benzoat eindeutig überlegen.

Mit ein Ziel dieser Untersuchungen war, einen Östradiolester aufzufinden, bei dem eine einmalige Injektion einer bestimmten Dosis am Menschen für einen Menstruationszyklus hinsichtlich Intensität und Dauer der Wirkung ausreichend ist. Ich glaube, diese Eigenschaften im Östradiol-17β-n-valerianat gefunden zu haben und einige klinische Untersuchungen, über die von anderer Seite berichtet werden wird, scheinen die Richtigkeit dieser Wahl zu bestätigen.

Einer der höheren Ester des Östradiols könnte klinisch für die Dauerbehandlung des Prostata-Carcinoms oder des Mammacarcinoms bei Patientinnen nach der Menopause in Zukunft Bedeutung gewinnen.

Auch bei den Östrogenestern möchte ich es vorläufig dahingestellt sein lassen, ob sie ihr protrahierte Wirkung ihrer verlangsamten Resorption oder weniger dieser als einem verlangsamten Abbau im Stoffwechsel und damit verzögerter Ausscheidung verdanken, oder ob die Eigenart ihrer Wirkung auf einer Kombination von verzögerter Resorption und verlangsamter Freisetzung des eigentlich wirksamen freien Östradiols beruht.

Zusammenfassung.

Es wird eine Reihe von Estern natürlicher und künstlicher Östrogene hinsichtlich Intensität und Dauer ihrer Wirksamkeit untersucht. Aus der Reihe dieser Ester wird das Östradiol-17β-n-valerianat ausgewählt, das voraussichtlich bei einmaliger Injektion am Menschen eine ausreichend dosierte, zyklusgerechte Behandlung bei sparsamstem Gebrauch des Östradiols erlaubt.

Literatur.

Junkmann, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 85 (1952).

Prof. Dr. Karl Junkmann, Hauplaboratorium der Schering A.G., Berlin-West, Müllerstr. 170—172.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 365—377 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt am Main.

Über die Beziehung des Darmstoffs zur Substanz P.

3. Mitteilung*.

Von

WALTHER VOGT**.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Juni 1953.)

In zwei früher mitgeteilten Versuchsreihen über die Beziehungen der enterogenen darmerregenden Stoffe „Substanz P" (U. S. VON EULER u. J. H. GADDUM) und „Darmstoff" (W. VOGT) zueinander wurde gefunden, daß Darmstoff in Substanz P-Präparaten enthalten ist und deren darmerregenden Effekt bewirkt, während die blutdrucksenkende P-Wirkung auf einem anderen Stoff beruht (FISCHER u. VOGT; VOGT 1950). Inzwischen hat sich herausgestellt, daß wäßrige oder alkoholische Darmextrakte außer Darmstoff noch eine weitere Substanz enthalten, die das zum Nachweis benutzte Froschrectum stark erregt und deren Wirkung gleichfalls durch Atropin nicht aufgehoben wird. Dieser als „Substanz DS" bezeichnete Wirkstoff läßt sich papierchromatographisch oder durch Gegenstromverteilung von Darmstoff abtrennen (VOGT 1952; VOGT unveröffentlicht).

Aus verschiedenen Gründen war zu vermuten, daß auch in Substanz P-Präparaten dieser Stoff vorhanden ist und die darmerregende Wirkung derselben nicht ausschließlich auf Darmstoff beruht.

Einmal gleicht das Wirkungsbild der Substanz P am Froschrectum sehr dem von Substanz DS. Während die Kontraktionen, die durch Darmstoff bewirkt werden, auch nach hoher Dosierung durch ausgiebige Erschlaffung voneinander getrennt werden, sind die durch Substanz DS in größeren Konzentrationen erzeugten Erregungen durch erhebliche Kontraktionsrückstände gekennzeichnet, so daß auf hohem Tonusniveau kurze frequente Kontraktionen geschrieben werden. Auch Substanz P bewirkt solche Verkürzungen. Zum anderen spricht für das Vorhandensein von Substanz DS in P-Präparaten die früher gemachte Beobachtung, daß in Papierchromatogrammen von mit sec.-Butanol entwickelter Substanz P im unteren Drittel darmerregende Wirkung zu finden war (FISCHER u. VOGT). Das wurde damals auf Adsorption von Darmstoff, der an sich mit der Lösungsmittelfront nach oben wandert, an Verunreinigungen zurückgeführt. Tatsächlich konnte durch wiederholte Chromatographie der in dieser unteren Zone enthaltenen Stoffe noch Wirkstoff herausgeholt und auf Grund seiner nunmehr eingenommenen Lage — dicht hinter der Lösungsmittelfront — als Darmstoff identifiziert werden.

* Herrn Prof. Dr. KURT FELIX zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Aber ein Teil der darmerregenden Wirkung blieb auch nach mehrfacher Chromatographie in den unteren Papierzonen mit den R_f-Werten 0,2—0,4. Diesen R_f-Wert hat auch Substanz DS (Vogt 1952).

Deshalb wurden die im folgenden mitgeteilten Versuche zur Fraktionierung der Substanz P-Präparate unternommen. Gleichzeitig sollte eine Diskrepanz zwischen Befunden v. Eulers und eigenen geklärt werden. Der Hauptschritt in der Darstellung von Substanz P ist deren Fällung mit Ammonsulfat aus schwach saurer wäßriger Lösung (v. Euler [1 u. 2]). von Euler erhielt mit diesem Verfahren sehr gute Ausbeuten (Auswertung am Kaninchendarm). Nach unseren Versuchen dagegen blieb dabei die größere Wirkstoffmenge in der Mutterlauge zurück (Auswertung am Froschrectum). Die Ausgangslösung, d. h. der wäßrige Darmextrakt enthält nun beträchtliche Mengen von darmhemmenden Stoffen, die auf Grund einer positiven Orcin-Reaktion wohl der Adenosingruppe zugerechnet werden dürfen. Der Kaninchendarm reagiert auf diese Verbindungen sehr empfindlich (Herbrand u. Jaeger), während sich das Froschrectum dagegen fast refraktär verhält (Vogt, unveröffentlicht). Es war zu erwarten, daß diese Hemmstoffe durch Ammonsulfat nicht gefällt würden. Daher schien es möglich, daß die gute Ausbeute an darmerregender Substanz durch Aussalzen nur vorgetäuscht würde, indem ein Verlust an Erregungsstoff durch Wegfall der Hemmstoffe kompensiert wurde, wenn man die Auswertung am Kaninchendarm vornahm. Das Ergebnis vorwegnehmend sei gesagt, daß diese Verhältnisse tatsächlich gefunden wurden. Sie erklären aber die Unterschiede im Ergebnis der Auswertung am Kaninchendarm einerseits und Froschrectum andererseits nicht allein, vielmehr sind es überhaupt verschiedene, in den Substanz P-Präparaten enthaltene Stoffe, die auf das eine bzw. andere Organ vorzugsweise wirken und die offenbar mit unterschiedlicher Ausbeute gefällt werden.

Ausgangsmaterial.

Als Ausgangsmaterial dienten zwei Substanz P-Präparate, die nach einer neueren Vorschrift v. Eulers (von Euler [3]) hergestellt wurden.

Darstellung des ersten Präparats: 3,4 kg von Fett und dem größten Teil der Schleimhaut befreiter Pferdedünndarm wurden 2mal mit 7,2 l Wasser und Schwefelsäurezusatz bis p_H 4 je 10 min gekocht, die Brühe dekantiert und im Vakuum auf 170 cm^3 eingeengt. Einstellung auf p_H 8,2 mit NaOH, Zusatz von 380 cm^3 96%igem Alkohol. Nach Absitzenlassen des entstandenen Niederschlags über Nacht im Eisschrank wurde zentrifugiert, der Niederschlag umgefällt, wieder zentrifugiert und die vereinigten Lösungen, auf p_H 6 gebracht, im Vakuum auf 110 cm^3 eingeengt. Mit Eisessig wurde darauf auf p_H 4,1 eingestellt, Ammonsulfat bis zur Sättigung eingetragen und die aufgetretene Fällung am nächsten Tage abgenutscht, abgepreßt, getrocknet und pulverisiert. Es wurden 5 g Substanz erhalten. 3 g davon wurden in 30 cm^3 Wasser gelöst (p_H etwa 4) und mit Ammonsulfat bis zur Sättigung umgefällt. Daraus wurden 2,6 g doppelt gefällte Substanz P erhalten.

Das zweite Präparat wurde aus 650 g Pferdedünndarm in gleicher Weise gewonnen und wog nach 2maliger Fällung 0,8 g.

Methodik.

Die Gegenstromverteilungen wurden in Scheidetrichtern von Hand durchgeführt. Mobile Phase ist immer die untere. Die Bezeichnung der Rohre ist die übliche von 0 bis n bei n-facher Verteilung. Rohr 0 enthält also die extrem in der oberen, Rohr n die in der unteren Phase bevorzugt löslichen Stoffe. Für Gegenstromverteilungen mit sehr kleinen Volumina der einzelnen Phasen (0,5—2 cm^3) bewährte sich folgende Methode: die beiden Phasen wurden in Zentrifugenspitzgläsern durch Aufwirbeln mittels Glasstab oder Mikrospatel ins Gleichgewicht gebracht, kurz zentrifugiert, die untere Phase mit einer capillar ausgezogenen Pipette abgesaugt und in das nächste Zentrifugenröhrchen übertragen usw.

Die biologische Auswertung der Verteilungsreihen erfolgte unter Atropin am Froschrectum nach J. Schüller in 10 cm^3 Frosch-Ringer-Bad, am Warmblüterdarm in 20 cm^3 Tyrode bei 37° und am Blutdruck des mit 1 g/kg Urethan narkotisierten und mit Atropin (1 mg/kg) vorbehandelten Kaninchens. Zu diesem Zweck wurden Proben der einzelnen Rohrinhalte (zusammengesetzt aus proportionalen Teilen der oberen und unteren Phase) auf dem Wasserbad eingedampft und der Rückstand in Ringer oder Tyrode gelöst. Soweit das Verteilungsmedium bereits NaCl enthielt, wurde mit soviel Wasser gelöst, daß die Salzkonzentration 0,9% ergab.

Zur Papierelektrophorese wurde die übliche Technik benutzt (Wieland u. Fischer). Papier: Schleicher und Schüll 2043b, Dauer der Elektrophorese 4—6 Std bei 110 Volt. Das p_H der Pufferlösungen wurde elektrometrisch kontrolliert[1]. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde der Standort der Wirkstoffe durch biologische Auswertung der wäßrigen Eluate des in Streifen zerlegten Papiers bestimmt. Ein gewisses Problem stellten die zu verwendenden Puffer wegen ihrer Eigenwirkungen auf den Darm dar. Leidlich brauchbar waren Gemische von 1% primärem und sekundärem Natriumphosphat, wenn auch nicht ganz frei von darmerregender Wirkung. Die Lokalisation der Wirkstoffe im Papierstreifen war hierbei gut möglich, vorausgesetzt, daß genügende Extraktmengen aufgetragen worden waren.

Papierchromatogramme wurden aufsteigend entwickelt. Papiersorte und Methode des Nachweises der Aktivität waren die gleiche wie bei der Elektrophorese. Eluate mit Butanol entwickelter Chromatogramme wurden zunächst eingedampft, um die meist noch vorhandenen Spuren des am Darm stark wirksamen Lösungsmittels zu entfernen.

Ergebnisse.

I.

Die beiden Substanz P-Präparate zeigten am Kaninchendarm die typische, protrahiert verlaufende atropinfeste Erregung und bewirkten die charakteristische, flüchtige Senkung des Kaninchenblutdrucks.

Der Vergleich der Präparate nach einmaliger Ammonsulfatfällung mit der Wirkung der zugehörigen Mutterlauge oder mit einer vor der Fällung abgezweigten Probe des Ausgangsextrakts ergab am *Froschrectum*, daß rund ein Drittel darmerregender Substanz gefällt worden

[1] Herrn Prof. Felix und seinen Mitarbeitern im Chemisch-Physiologischen Institut der Universität Frankfurt, die entgegenkommenderweise die Benutzung von für die Arbeit notwendigen Apparaten gestatteten und dabei jederzeit behilflich waren, bin ich für die freundliche Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

war, während sich der Rest noch in der Mutterlauge befand. Am *Kaninchendarm* wirkte der Ausgangsextrakt in einigen Fällen etwas stärker, in anderen nicht stärker als die daraus erhaltene Substanz P, was im Einklang mit der von v. Euler beschriebenen guten Ausbeute steht. Es ließ sich aber am Kaninchendarm erkennen, daß der Ausgangsextrakt Hemmstoffe enthielt, die nach der Ammonsulfatfällung in der Mutterlauge verblieben. Daher hatte hier der Ausgangsextrakt eine zweiphasische Wirkung: Hemmung—Erregung, die Ammonsulfatfällung (= Substanz P) wirkte praktisch rein erregend und die zugehörige Mutterlauge hatte vorwiegend hemmende Wirkung (Abb. 1). Es ist anzunehmen,

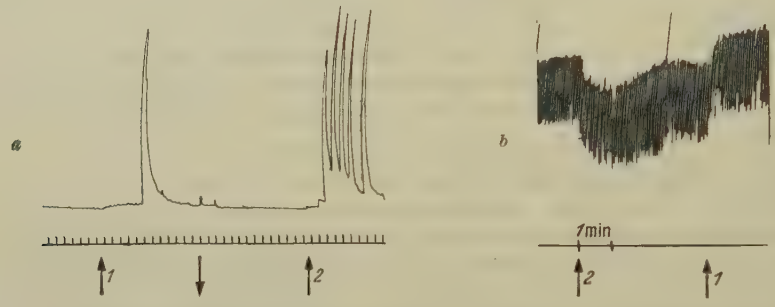


Abb. 1. Wirkung äquivalenter Mengen eines Substanz P-Präparates und der Mutterlauge, aus der es gefällt worden war. Atropin 1:2 Mill. *a* Froschrectum; $1 = \frac{1}{25000}$ des P-Präparates (= 0,2 mg, in 0,2 cm³); $2 = \frac{1}{25000}$ der zugehörigen Mutterlauge (in 0,2 cm³). Die Mutterlauge enthält mehr darmerregende Substanz als das P-Präparat. *b* Kaninchendünndarm; $1 = \frac{1}{5000}$ des P-Präparates (= 1 mg, in 0,1 cm³); $2 = \frac{1}{5000}$ der zugehörigen Mutterlauge (in 0,1 cm³). Die Mutterlauge zeigt hier hemmende Wirkung.

daß die hemmenden Substanzen Adenosinverbindungen sind, die, wie bereits erwähnt, am Froschrectum nicht weiter stören, den Kaninchendarm aber sichtbar beeinflussen. Wie erwartet gaben die Ausgangsextrakte eine starke Orcinreaktion mit Bials Reagens. Aus der Intensitätsbestimmung der dabei entstehenden Grünfärbung im Pulfrich-Stufenphotometer ergab sich, daß von den orcinpositiven Substanzen rund 95% in der Mutterlauge verblieben und nur 5% in das Substanz P-Präparat gelangt waren.

Aus der biologischen und colorimetrischen Verfolgung der Fällung von Substanz P mittels Ammonsulfat geht also hervor, daß mit dieser Methode nur ein Teil der vorhandenen darmerregenden Substanzen gewonnen wird und daß die bei Auswertung am Kaninchendarm gut erscheinende Ausbeute sich zum Teil dadurch erklärt, daß trotz der Verluste die erregenden Stoffe gegenüber den hemmenden angereichert werden.

II.

1,75 g doppelt gefällte Substanz P wurde bei p_H 4,1 — dem p_H, mit dem sich das Präparat in Wasser löste — der 24fachen Gegenstromverteilung zwischen je 50 cm³ Wasser und 150 cm³ n-Butanol (miteinander gesättigt) unterworfen. In einem vorangegangenen Versuch wurde statt reinen Wassers Bernsteinsäurepuffer von p_H 4,2 zur Stabilisierung des p_H gebraucht. Die Anwesenheit des Puffers störte aber die biologische Auswertung, so daß er in den Hauptversuchen weggelassen wurde. Eine Kontrolle zeigte, daß auch ohne Puffer das p_H über die ganze Verteilungsreihe hinreichend gleich blieb. In dem hier beschriebenen Versuch fiel es kontinuierlich von p_H 5,2 in den ersten Rohren auf 4,1 in den letzten. Die biologische Auswertung der Wirksamkeit am *Froschrectum* ergab drei Maxima. Die erste erregende Fraktion fand sich in den Rohren 0 bis 3, dann zeigte sich ein neues Wirkungsmaximum in den Rohren 12 bis 14, und schließlich war unerwarteterweise die Endfraktion, Rohr 21 bis 24, wieder stark wirksam (Abb. 2a). Am *Kaninchendarm* war das Bild in bezug auf die Anfangs- und Endfraktion ähnlich, es fehlte aber die darmerregende Wirkung in der Mitte der Verteilungsreihe fast vollständig (Abb. 2b). Eine *blutdrucksenkende* Wirkung hatten nur die Inhalte der letzten Rohre, am stärksten etwa in Rohr 23 (Abb. 2c). Alle Wirkungen waren auch unter Atropin sichtbar.

Um einen Anhalt für den relativen Anteil der einzelnen Fraktionen an der gesamten Darmwirkung der P-Präparate zu bekommen, wurde die Verteilungsreihe an den — nur annähernd bestimmbaren — Stellen minimaler Wirkung zwischen Rohr 5 und 6 sowie zwischen 18 und 19 geteilt und entsprechend den drei Wirkungsmaxima in drei Sammelfraktionen zusammengefaßt. Fraktion a = Rohr 0—5, Fraktion b = Rohr 6—18, Fraktion c = Rohr 19—24. Am Froschrectum und Rattendünndarm war hauptsächtlich Fraktion b wirksam, a und c traten in der Wirkung zurück. Gerade umgekehrt beruhte die Substanz P-Wirkung am Kaninchendarm praktisch ausschließlich auf dem Einfluß von Fraktion a und c, wobei meist, aber nicht immer, c überwog[1]. Blutdrucksenkende Wirkung wurde nur in Fraktion c gefunden, a und b zusammen hatten noch nicht den zehnten Teil der Wirkung von c.

Im zweiten Substanz P-Präparat, das in entsprechender Weise fraktioniert wurde, waren ebenfalls die drei darmerregenden Gruppen vorhanden. Es enthielt relativ etwas mehr Wirkstoff der Fraktion a und weniger von b.

Der Träger der Darmwirkung von Fraktion a ist Darmstoff. Das geht aus der Stellung dieser Fraktion in der Verteilungsreihe hervor,

[1] Infolge der individuellen Empfindlichkeitsunterschiede wechselt das Wirkungsverhältnis natürlich etwas.

die dem — für biogene darmerregende Stoffe ungewöhnlich hohen — Verteilungskoeffizienten von 5—6 im System Butanol/Wasser entspricht, durch den der Darmstoff gekennzeichnet ist (Vogt 1953). Auch im Papierchromatogramm wanderte Fraktion a, mit sec.-Butanol entwickelt, wie Darmstoff, d. h. die wirksame Zone lag dicht hinter der Lösungsmittelfront (R_f 0,8—1).

Die Aktivität der Fraktion b beruht auf Substanz DS. Die Lage des Maximums dieser Fraktion ist genau die gleiche wie die der Substanz DS,

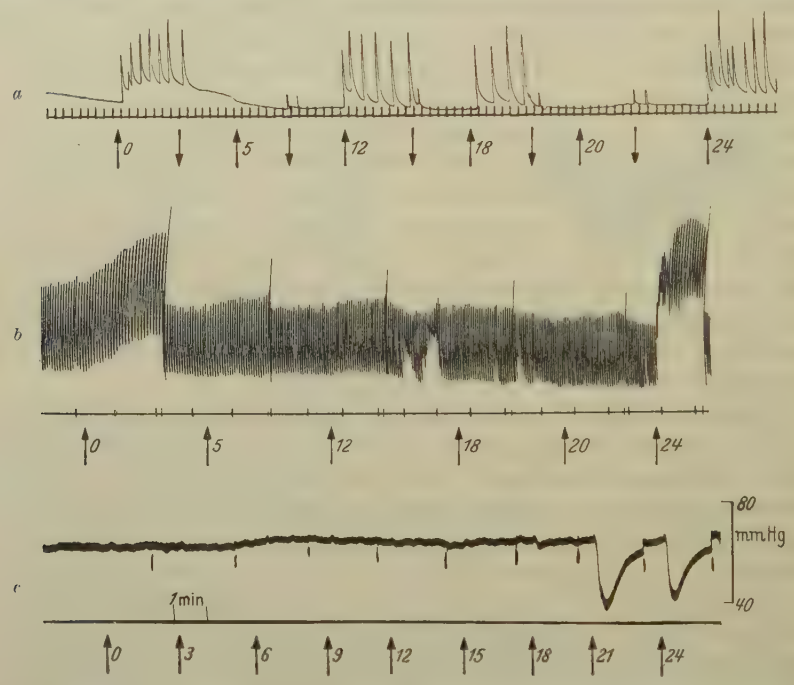


Abb. 2. Wirkung der Fraktionen einer 24fachen Gegenstromverteilung (150 cm³ Butanol/50 cm³ Wasser, p_H 4—5) von Substanz P auf *a* Froschrectum; Anfangs-, Mittel- und Endfraktionen wirken erregend (jeweils $\frac{1}{400}$ des betreffenden Rohrinhaltes); *b* Kaninchendarm; Anfangs- und Endfraktionen wirken erregend (jeweils $\frac{1}{500}$ des betreffenden Rohrinhalts); *c* Kaninchenblutdruck; nur die Endfraktion wirkt (jeweils $\frac{1}{400}$ des betreffenden Rohrinhaltes). Die Zahlen geben die Nummer des ausgewerteten Rohrs der Verteilungsreihe an.

die zur Darstellung eines Standardpräparats in früheren Experimenten im gleichen System verteilt wurde (Vogt 1953) — entsprechend einem Verteilungskoeffizienten von $^1/_3$ (bezogen auf *gleiche* Volumina beider Phasen!). Auch im Papierchromatogramm mit sec.-Butanol lief der Wirkstoff der Fraktion b wie Substanz DS (R_f 0,3). Wurden die Chromatogramme mit Wasser entwickelt, so blieben sowohl Substanz DS

als auch Fraktion b der Substanz P-Verteilung am Startpunkt sitzen. Auch hier finden wir also Übereinstimmung. Außerdem spricht die pharmakologische Wirkung für die Identität. Beide Stoffe sind besonders wirksam am Froschrectum, wogegen der Kaninchendarm nur sehr schwach reagiert.

Substanz DS hat große Ähnlichkeit mit Enteramin, einer darmerregenden Substanz, die V. Erspamer hauptsächlich aus Drüsen von Octopoden, aber auch aus Kaninchenmagenschleimhaut gewann (Erspamer 1940) und kürzlich mit 5-oxy-Tryptamin identifizieren konnte (Erspamer 1952). Die Verwandtschaft tritt in folgenden Eigenschaften zutage: gute Wirksamkeit am isolierten Rattenduodenum und sehr schwache am Kaninchendarm; R_f-Werte der gleichen Größenordnung in einander entsprechenden Papierchromatogrammen, Diazoreaktion mit p-Nitranilin, Violettfärbung mit KJO_3. Diese Eigenschaften und Reaktionen wurden von Erspamer für Enteramin angegeben und treffen nach eigenen Versuchen ebenfalls für Substanz DS zu.

In der Fraktion c wurde zunächst Histamin vermutet, das sich, wie Kontrollversuche zeigten, in dieser Fraktion anreichern mußte, wenn es vorhanden war. Von Euler hatte allerdings eine Beteiligung von Histamin an der Darmwirkung von P-Präparaten nicht gefunden (v. Euler [1]). Es paßte außerdem nicht zu Histamin, daß Fraktion c am Froschrectum wirkte. Im Einklang mit früheren Beobachtungen (Vogt 1949) und der von anderer Seite festgestellten Wirkungslosigkeit des Histamins am Froschdarm (Feldberg u. Schilf [1]) haben wir uns immer wieder davon überzeugen können, daß das Froschrectum sich Histamin gegenüber refraktär verhält.

Histamin läßt sich als freie Base, d. h. in alkalischem Medium, aus Wasser in höhere Alkohole schütteln (z. B. in Amylalkohol [Koessler u. Hanke]). Um die Frage einer Histaminbeteiligung entscheiden zu können, wurde deshalb Fraktion c zwischen jeweils 4 cm^3 n-Butanol und 2 cm^3 n/5 NaOH 4fach verteilt (in anderen Versuchen 5fache Verteilung zwischen je 10 cm^3 n-Butanol und n/4 NaOH mit prinzipiell gleichem Ergebnis). Die kurze Verteilungsreihe wurde gewählt, um schnell arbeiten zu können, damit die Stoffe nicht zu lange der Alkaliwirkung ausgesetzt waren. Anschließend an die Verteilung wurde jeder Rohrinhalt mit HCl neutralisiert. Das dadurch gebildete Kochsalz wurde bei der Überführung in physiologische Lösung berücksichtigt. Die Auswertung zeigte ganz unerwartet wieder zwei Maxima von Darmwirkung. Rohr 0 wirkte am Kaninchendarm am stärksten, aber in Rohr 4 war offensichtlich ein neues, schwächeres Maximum (Abb. 3b). Am Froschrectum zeigten umgekehrt Rohr 3 und 4 die stärkste Wirkung, die nach Rohr 0 hin gleichmäßig abfiel (Abb. 3a). Am Kaninchenblutdruck war Rohr 0 am stärksten wirksam, von da an nahm die Wirkung gleichmäßig ohne neues Maximum ab (Abb. 3c). Die Fraktion 3 besteht also aus mindestens zwei Stoffen, von denen der eine, bei alkalischer Reaktion

vorwiegend butanollösliche, am Blutdruck und Darm des Kaninchens stark wirksam ist (= c_1), aber nur schwach oder möglicherweise gar nicht am Froschrectum. Der andere Stoff (= c_2) hat keine Blutdruckwirkung, ist aber der Hauptträger der Darmwirkung von Fraktion c am Froschrectum.

Das Verhalten der Fraktion c_1 bei den Gegenstromverteilungen deutet auf basische Natur: bei saurer Reaktion der Lösung, also als Salz, geht der Stoff bevorzugt in die Wasserphase (Fraktion c – letzte Rohrgruppe der zuerst durchgeführten, 24fachen sauren Verteilung), bei alkalischer

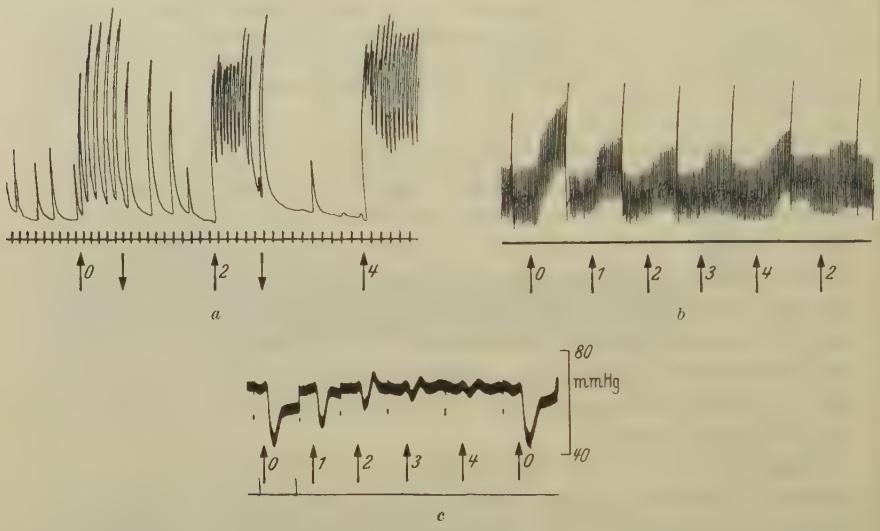


Abb. 3. Wirkung der Fraktionen einer 4fachen Gegenstromverteilung (4 cm³ Butanol/2 cm³ n/5 NaOH) von Fraktion *c* auf *a* Froschrectum; Maximum der Wirkung am Ende der Verteilungsreihe (jeweils $\frac{1}{6}$ des betreffenden Rohrinhalts); *b* Kaninchendarm: Hauptwirkung am Anfang, neues, schwächeres Maximum am Ende der Verteilungsreihe (jeweils $\frac{1}{6}$ des betreffenden Rohrinhalts); *c* Kaninchenblutdruck; Maximum der Wirkung am Anfang der Verteilungsreihe (jeweils $\frac{1}{10}$ des betreffenden Rohrinhalts). Die Zahlen bezeichnen die Nummer des getesteten Rohrs.

Reaktion in die organische Schicht als undissoziierte freie Base (Fraktion c_1 = vorderste Rohrgruppe der zweiten, alkalischen Verteilung). Diese Eigenschaften entsprechen denen des Histamins. Auch die vielleicht ganz fehlende Wirkung am Froschrectum würde mit Histamin übereinstimmen. Dennoch handelt es sich nicht darum. Quantitative Vergleiche von Fraktion c_1 mit Histamin am Kaninchendarm und Meerschweinchendarm deckten große Unterschiede in der Wirksamkeit auf. Eine Dosis c_1, die am Kaninchendarm mit Histamin 1:5 Mill. wirkungsgleich war, wirkte am Meerschweinchenileum viel schwächer als Histamin 1:40 Mill. Außerdem verhindert Antistin die c_1-Wirkung nicht, im Gegen-

satz zu einer gleichstarken Histaminwirkung. Durch Papierchromatographie mit Wasser als Entwickler lassen sich die beiden Stoffe glatt voneinander trennen. Histamin bleibt dabei ähnlich wie Substanz DS infolge Adsorption in der Nähe des Startpunktes sitzen, während man die Wirkung von c_1 kurz hinter der Wasserfront wiederfindet. Unter der Voraussetzung, daß Blutdruck- und Darmwirkung von c_1 auf dem gleichen Stoff beruhen, läßt sich auch diese Wirkungskombination als gegen Histamin sprechend anführen. Histamin wirkt, von Ausnahmen abgesehen, am Kaninchen in Äther- oder Urethannarkose nicht blutdrucksenkend (v. Euler [1]; Feldberg u. Schilf [2]).

Zur Frage der Identität des darm- und kreislaufaktiven Prinzips in Fraktion c_1 wurde eine Reihe von Versuchen mit dem Ziel der Trennung der beiden Wirkungen angeschlossen.

Papierchromatographie mit verschiedenen Lösungsmitteln führte zu keiner erkennbaren Fraktionierung. Da U. S. von Euler 1942 berichtet hatte, daß Substanz P sich amphoter verhalte, indem sie bei p_H 6,43 im elektrischen Feld kathodisch, bei p_H 7,09 aber anodisch wanderte (von Euler [3]), wurde eine Trennung in diesem p_H-Bereich durch Papierelektrophorese versucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen v. Eulers erhielt ich aber bis p_H 8,1 hinauf nur kathodische Wanderung, sowohl was die blutdrucksenkende als auch die davon nicht abgetrennte darmerregende Wirkung angeht. Der Wirkstoff von c_1 zeigt demnach auch elektrophoretisch ein basisches Verhalten. Allenfalls könnte es ein Ampholyt mit noch weiter im alkalischen Bereich liegendem isoelektrischen Punkt sein.

Auch durch weitere Gegenstromverteilungen wurde die Auftrennung von Fraktion c_1 versucht. Entsprechend dem Verhalten in den beiden erwähnten Verteilungen liegt der Verteilungskoeffizient k (Butanol/Wasser) bei saurer Reaktion weit unter 1 und bei stark alkalischer Reaktion weit über 1. Es mußte daher ein p_H zu finden sein, bei dem sich die c_1-Fraktion gemäß einem k von etwa 1 verteilt. In diesem Bereich bestehen die besten Trennungsaussichten für einander ähnliche Stoffe. Nach Vorversuchen schien p_H 9,8 günstig. Es wurden 2 Gegenstromverteilungen (die eine 8fach) im System n-Butanol/n/2 Soda-Bicarbonatpuffer von p_H 9,8 durchgeführt. Eine Trennung ließ sich nicht erkennen. Das Maximum der Blutdrucksenkung und der Darmerregung lag in der Mitte der Reihe.

In einer letzten Versuchsserie wurde Fraktion c_1 mit Trypsin verdaut. Nach v. Euler wird sowohl die blutdrucksenkende als auch die darmerregende Wirkung von Substanz P durch Trypsin zerstört (v. Euler [1]). H. Fischer und W. Vogt fanden dagegen, daß zwar die Gefäß-, nicht aber die Darmwirkung nach Trypsinverdauung erloschen war (Fischer u. Vogt). Das erklärt sich aus der komplexen Zusammensetzung der P-Präparate. Es blieb aber noch die Frage zu klären, ob auch die Wirkungen der Fraktion c_1 allein noch durch Trypsinverdauung differenziert werden konnten. Alle zu diesem Zweck durchgeführten Versuche erbrachten das gleiche Ergebnis: beide Wirkungen von c_1 wurden durch Trypsin crist. (Armour[1]) zerstört.

Eine Trennung der Fraktion c_1 in zwei Unterfraktionen, von denen jede ausschließlich oder vorwiegend eine der beiden Wirkungen trüge, wurde also mit keiner Methode erreicht, so daß man annehmen möchte,

[1] Herrn Dr. Bromig habe ich sehr für die Beschaffung und freundliche Überlassung des Trypsins zu danken.

daß es sich hier um eine einheitliche, blutdrucksenkende und darmerregende organische, Peptidbindungen enthaltende Base handelt.

Der Wirkstoff der Fraktion c_1 ist möglicherweise mit Bradykinin (M. Rocha e Silva 1949) bzw. mit Kallidin (E. Werle), das mit Bradykinin als identisch angesehen wird, verwandt. Bradykinin wird durch Einwirkung von Schlangengiften oder Trypsin auf Blutglobulin gebildet, Kallidin entsteht in ähnlicher Weise durch Kallikreineinwirkung auf Blut. Diese Stoffe wirken ebenfalls blutdrucksenkend und erregen den Kaninchen- und Meerschweinchendarm. Nach einer persönlichen Mitteilung von Herrn Prof. Werle wirkt Kallidin nicht am Froschrectum. Bromig fand an diesem Organ keine Wirkung von Bradykinin (Bromig). Bradykinin und Kallidin werden zwar nicht durch Trypsin selbst, wohl aber durch Trypsin*präparate* infolge eines Gehalts an Chymotrypsin, das auch in kristallisierten Trypsinpräparaten vorkommen kann, angegriffen (Rocha e Silva 1951; Werle, Kehl u. Koebke). Kallidin zeigt im Elektrophoreseversuch basisches Verhalten (Werle, Kehl u. Koebke). Alle diese Eigenschaften kennzeichnen auch die Fraktion c_1 der Substanz P-Präparate. Sollte sich die Identität herausstellen, so ergibt sich unter anderem die Frage, ob die c_1-Base von vornherein in den extrahierbaren Mengen im Gewebe enthalten ist, oder ob sie erst nach der Zerstörung des Darmgewebes im Verlauf der Aufarbeitung durch das im Darm vorhandene Trypsin gebildet wird.

Wie Darmstoff und Substanz DS wird auch die c_1-Fraktion durch Ammonsulfat nicht wirklich gefällt. In wäßrigen Lösungen von c_1 erzeugt Ammonsulfat keinen Niederschlag oder auch nur eine Trübung. Die „Fällung" von Substanz P durch Ammonsulfat beruht offenbar lediglich auf Adsorption an andere, tatsächlich gefällte Ballaststoffe, nicht auf einer Aussalzung der Wirkstoffe selbst, vielleicht mit Ausnahme der Fraktion c_2.

Über Fraktion c_2 kann noch nichts näheres ausgesagt werden. Hierin befindet sich der ganze aussalzbare, das Hauptgewicht der Substanz P-Präparate ausmachende Ballast, aus dem heraus eine Anreicherung des Wirkstoffs noch nicht gelang. Wenn Cholin vorhanden wäre, müßte es sich in dieser Fraktion finden. Es ist aber unwahrscheinlich, daß Cholin bei der Wirkung von c_2 eine Rolle spielt. Zwar kann es in hohen Dosen am Kaninchendarm auch unter Atropin eine Erregung setzen, worauf bereits v. Euler früher hinwies (v. Euler [1]), aber am Froschrectum wurde so etwas nicht gesehen, und gerade hier ist c_2 besonders wirksam, während es am Kaninchendarm eine weit schwächere Wirkung entfaltet. Möglicherweise handelt es sich in der Fraktion c_2 gar nicht um einen besonderen, hochwirksamen Stoff. Vielleicht wirkt hier ein Stoffgemenge lediglich unspezifisch als „Nährlösung". Am Froschrectum war nach mehrmaliger Anwendung häufig ein starker Rückgang der Wirkung zu beobachten.

Besprechung der Ergebnisse.

Entsprechend dem unten gezeigten Schema ließ sich Substanz P in vier darmerregende Fraktionen zerlegen, von denen eine — c_1 — gleichzeitig die typische Blutdrucksenkung verursacht.

Bei Fraktion a handelt es sich um Darmstoff. Damit wird die früher schon getroffene Feststellung erhärtet, daß in Substanz P-Präparaten Darmstoff enthalten ist. Nur ist dieser Wirkstoff nicht der einzige Träger der Darmwirkung, wie wir damals glaubten, sondern es sind noch andere

Stoffe daran beteiligt: die enteraminähnliche Substanz DS, ferner eine Peptidbase (= c_1) und ein noch nicht näher zu beschreibender weiterer Stoff (= c_2).

Die Wirkung der durch Ammonsulfatfällung erhaltenen P-Präparate beruht am Froschrectum hauptsächlich auf dem Gehalt an Substanz DS. Die c_1-Base tritt hier ganz zurück, falls sie überhaupt wirkt. Am Kaninchendarm dagegen sind vorwiegend Fraktion c_1 und Darmstoff für die Erregung verantwortlich. Blutdrucksenkend wirkt nur Fraktion c_1.

Substanz P
1. Verteilung, sauer

a	b	c
Darmstoff	Substanz DS	┆

2. Verteilung, alkalisch

c_1	c_2
Organ. Base	?

Nachdem alle weiteren Fraktionierungsversuche erfolglos blieben, darf wohl angenommen werden, daß es der gleiche Wirkstoff in der Fraktion c_1 ist, der Darmerregung *und* Blutdrucksenkung verursacht. Daher wäre diese Fraktion als eigentliche Substanz P zu bezeichnen, denn auf sie — und *nur* auf sie — paßt die Definition der Substanz P als eines atropinfest darmerregenden und blutdrucksenkenden Stoffs (v. Euler u. Gaddum). Die übrigen wirksamen Faktoren in den rohen P-Präparaten — Darmstoff, Substanz DS — wären dann als Verunreinigungen anzusehen.

Unsere Versuche geben allerdings keinen Anhalt dafür, daß es sich hier um einen amphoteren Stoff mit einem isoelektrischen Punkt zwischen p_H 6,43 und 7,09 handelt, wie das 1942 für Substanz P beschrieben wurde (v. Euler [3]). Der c_1-Wirkstoff wanderte auch bei p_H 8,1 noch zur Kathode, verhielt sich also basisch. Die Diskrepanz ist schwer zu erklären. Wenn die Auswertung der Elektrophoreseversuche v. Eulers am Kaninchenblutdruck vorgenommen wurde, kann es sich nur um die Beobachtung von c_1 gehandelt haben. Am Kaninchendarm ausgewertet käme außerdem noch Darmstoff in Frage. Es bestehen Anhaltspunkte dafür, daß Darmstoff eine Säure ist, aber ebenfalls kein Ampholyt. Vielleicht ist es möglich, daß die c_1-Base in den noch nicht weiter fraktionierten rohen Substanz P-Präparaten an amphotere Begleitstoffe adsorbiert und im elektrischen Feld von diesen mitgeschleppt wird. Das wäre eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse.

Beide Wirkungen von c_1 werden durch Trypsin zerstört. Damit hat diese Fraktion wieder die für Substanz P angegebenen Eigenschaften. In den Versuchen von H. Fischer und W. Vogt — mit rohen P-Präparaten — wurde nach Trypsinverdauung lediglich ein Verlust an blut-

drucksenkender Wirkung festgestellt, während die Darmwirkung unverändert blieb. Soweit in jenen Versuchen die Auswertung am Froschrectum vorgenommen wurde, ist dies Ergebnis mit den neuen Erkenntnissen ohne weiteres in Einklang zu bringen. Die einzige Fraktion der Substanz P-Präparate, die ihre Wirkung durch tryptische Verdauung verliert — c_1 —, wirkt am Froschrectum sowieso nicht; daher konnte der Ausfall an diesem Organ gar nicht sichtbar werden. Am Kaninchendarm, wo c_1 wesentlich an der P-Wirkung beteiligt ist, hätte ein Wirkungsverlust eigentlich erkennbar sein sollen.

Vielleicht war zufällig das damals benutzte P-Präparat besonders reich an Darmstoff, so daß der Verlust von c_1 nach Trypsinbehandlung an der Gesamt-Darmwirkung einen nur kleinen, noch in die Fehlergrenze fallenden Anteil ausmachte.

Die ähnlichen Eigenschaften von Histamin und der c_1-Base erschweren die Trennung der beiden Substanzen voneinander. Prinzipiell ist sie durch Papierchromatographie mit Wasser möglich, die dabei verarbeitbaren Mengen sind aber recht beschränkt. Vorläufig scheint daher die von v. Euler erstmals angewandte Fällung mit Ammonsulfat das beste Mittel zu sein, histaminfreie c_1-Präparate zu gewinnen. Das Verfahren hat außerdem den Vorteil, daß die darmhemmenden Adenosinverbindungen entfernt werden. Es darf aber nicht übersehen werden, daß die Aussalzung keine quantitative Methode ist. Die dadurch erzielte Ausbeute hängt wahrscheinlich mehr von der Art und Menge der Begleitstoffe als der c_1-Base selbst ab, da es sich nur um ein Mitreißen handelt. Eine erhebliche Anreicherung von c_1 läßt sich anschließend durch die beiden beschriebenen Gegenstromverteilungen erreichen, wobei die erste — bei saurer Reaktion vorgenommene — vorwiegend eine Reinigung von den anderen darmerregenden Stoffen, die zweite — in alkalischem Medium — vor allem eine gewichtsmäßige Anreicherung bedeutet. Alles was durch Ammonsulfat fällbar ist, wird bei dieser zweiten Verteilung von der eigentlichen Substanz P abgetrennt.

Zusammenfassung.

1. Durch Gegenstromverteilungen — a) im System n-Butanol/Wasser bei p_H 4; b) zwischen Butanol/NaOH — wurden Substanz P-Präparate in vier darmerregende Stoffe aufgetrennt, von denen einer gleichzeitig blutdrucksenkend wirkt. Es sind dies: Darmstoff; Substanz DS, eine möglicherweise mit Enteramin identische Verbindung; eine organische Peptid-Base (c_1); ein noch nicht näher zu beschreibender Stoff.

2. Am Kaninchendarm beruht die Wirkung der Substanz P-Präparate vorwiegend auf dem Gehalt an Darmstoff und der c_1-Base. Am Froschrectum und Rattendarm herrscht die Wirkung von Substanz DS vor. Die Blutdruckwirkung von Substanz P-Präparaten wird nur durch die c_1-Fraktion bewirkt.

3. Die c_1-Base ist als die *eigentliche* Substanz P anzusehen, die in rohen P-*Präparaten* mit anderen Wirkstoffen verunreinigt ist. Sie wird durch Trypsin zerstört, im Gegensatz zu Darmstoff und Substanz DS.

4. Die Fällung der darmwirksamen Stoffe aus Extrakten mit Ammonsulfat (= Substanz P-Fällung) bewirkt eine Abtrennung von Adenosinverbindungen und Histamin. Andererseits ist sie nicht zur quantitativen Gewinnung der darmerregenden Stoffe geeignet, da sie nicht vollständig verläuft. Sind die Substanzen durch Gegenstromverteilungen gereinigt, so werden sie durch Ammonsulfat nicht mehr gefällt.

Literatur.

Bromig, G.: Dissertation Frankfurt (in Vorbereitung). — Erspamer, V.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 343 (1940). — Erspamer, V., and B. Asero: Nature **169**, 800 (1952). — von Euler, U. S.: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 181 (1936). — (2) Skand. Arch. Physiol. **73**, 142 (1936). — (3) Acta Physiol. Scand. **4**, 373 (1942). — von Euler, U. S., and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **72**, 74 (1931). — Feldberg, W., u. E. Schilf: (1) Histamin, Berlin 1930, S. 170. — (2) Histamin, Berlin 1930, S. 123. — Fischer, H., u. W. Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 91 (1950). - Herbrand, W., u. K. H. Jaeger: Das Adenylsäuresystem, S. 45. Berlin 1943. — Koessler, K. K., u. M. T. Hanke: zit. aus Feldberg, W., u. E. Schilf: Histamin, S. 20. Berlin 1930. — Rocha e Silva, M.: Amer. J. Physiol. **156**, 261 (1949). — Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 271 (1951). — Schüller, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **90**, 196 (1921). — Vogt, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 1 (1949); **210**, 31 (1950); **216**, 203 (1952); **219**, 138 (1953). — Unveröffentlicht. — Werle, E.: Biochem. Z. **320**, 372 (1950). — Werle, E., R. Kehl u. K. Koebke: Biochem. Z. **321**, 213 (1950). — Wieland, Th., u. E. Fischer: Naturwiss. **35**, 29 (1948).

Dr. Walther Vogt, (20b) Göttingen, Medizin. Forschungsanstalt, Pharmakolog. Abt., Bunsenstr. 10.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 378—390 (1953).

Aus dem Institut für animalische Physiologie der Universität Frankfurt-Main
(Direktor: Prof. Dr. K. Wezler).

Die Wirkung der Purine und ihrer Substituenten auf die Dynamik des isolierten, spontan schlagenden Froschherzens.

Von

G. Neuroth, K. Wezler und G. Sieglitz.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Mai 1953.)

Die Ergebnisse unserer modifizierten Methode nach Frank zur Druck-Volumen-Registrierung am isolierten Froschherzen, die eine Änderung der Druck-Volumdiagramme in der bisherigen Form forderten (Neuroth-Wezler), ließen auch neue Untersuchungen über die Wirkung von Pharmaka auf das isolierte Froschherz notwendig erscheinen. Zuerst untersuchten wir die Wirkung der Purine und ihrer Abkömmlinge, weil sie von so großer therapeutischer Bedeutung sind, um so mehr, als alle bisherigen Versuche „keine gemeinschaftliche Deutung erlauben und die Frage einer weiteren Bearbeitung bedarf" (Bock).

Bei Durchsicht der Literatur kann man immer wieder feststellen, daß die *angewandten Untersuchungsmethoden* verantwortlich für die unterschiedlichen Ergebnisse sind; die wenigsten Methoden werden den Frankschen Forderungen, nämlich der physikalisch einwandfreien Registrierung der Minima und Maxima des Druckes und des Volumens, gerecht. Die meisten Versuche sind mit der Straubschen Anordnung durchgeführt, wobei das Herz einmal wegen der geringen Belastung praktisch keine Arbeit leistet, zum andern durch die Art der Aufschreibung (Suspensionshebel) wirklich keine Angaben über Volumänderungen gemacht werden können (Sulzer). Die Fragestellungen sind meist sehr speziell, die Befunde selbst, die Benennung und Deutung der gefundenen Tatsachen außerordentlich uneinheitlich und selbst die Dosierung der gegebenen Pharmaka schwankt in so großen Bereichen, daß es fast unmöglich erscheint, eine einheitliche Wirkung nachzuweisen. Am Schluß unserer Arbeit wollen wir einzelne der sehr zahlreichen früheren Ergebnisse in die Diskussion einbeziehen, zunächst uns aber mit einem kurzen Überblick begnügen.

Die *absolute Kraft*, die in den früheren Arbeiten immer wieder entscheidend zur Beurteilung herangezogen wird, galt als die Fähigkeit des Herzens, gegen einen bestimmten Überlastungsdruck noch ein Schlagvolumen zu fördern, bzw. gegen den nächst höheren nicht mehr. Diesen Punkt zu bestimmen, ist außerordentlich schwer; fraglich ist, ob er überhaupt existiert, weil er sehr weit außerhalb des physiologischen Druckes liegt (bei unserer Versuchsanordnung förderten die Herzen noch gegen

Überlastungsdrucke von 150 cm H_2O ein Schlagvolumen). Deshalb erscheint uns diese Größe *zur Beurteilung der Wirkung eines Pharmakons nicht geeignet.*

Die *Beurteilung der Wirkung eines Pharmakons* auf das isolierte Herz wollen wir nach den im folgenden aufgezählten Gesichtspunkten vornehmen; anschließend sollen die wichtigsten Ergebnisse früherer Untersucher angeführt werden. Wir möchten unterscheiden:

1. Die Beeinflussung der *Kontraktilität.* In unseren Versuchen findet sie ihren Ausdruck in dem Verhalten der isotonischen und isometrischen Maxima (Schlagvolumen bzw. entwickelte Spannung). Bei früheren Untersuchern entspricht dem das Pulsvolumen bzw. der isometrische systolische Spannungszuwachs.

2. Die Beeinflussung der *Anfangsfüllung*; dafür wurde vielfach der Begriff „Tonus" gebraucht (auch einfach „Dehnbarkeit"). In unseren Versuchen wird sie durch das Verhalten der isotonischen Minima gekennzeichnet.

3. Das Verhalten der *Frequenz.* Dabei ist es einmal wichtig, hier klar herauszustellen, wie sich die Frequenz eines isolierten Herzens ohne Pharmakon verhält.

Beim *Coffein*, welches in Verdünnungen 1:100—1:40000 untersucht wurde, wird die Wirkung auf die drei oben genannten Größen in der Literatur wie folgt angegeben:

1. Pulsvolumen: gar nicht beeinflußt bis stark vermehrt.
2. „Dehnbarkeit": entweder nicht berücksichtigt oder unbeeinflußt gefunden.
3. Frequenz: sowohl vermindert wie gleichbleibend wie in seltenen Fällen auch vermehrt gefunden (Dreser, Frank, Preobrachensky, Junkmann, Symes, Eismayer und Quincke, Langecker, Hendrych, Sanders).

Wirkung von *Theophyllin* bei hohen Konzentrationen bis 1:1500:

1. Pulsvolumen verringert,
2. Dehnbarkeit vermindert,
3. Frequenzzunahme.

Bei geringerer Konzentration bis 1:30000 ist 1 und 2 vermehrt, die Frequenz nimmt ebenfalls zu (Symes, Bock).

Wirkung von *Theobromin* bei Konzentration 1:20000 Zunahme von allen drei Größen, angeblich zweimal weniger wirksam als Coffein (Bülbring, Symes, Bock).

Wirkung von *Paraxanthin* ähnlich wie Theophyllin. Bei gleicher Dosierung etwas mehr als die Hälfte der Wirkung desselben (Unna und Winiwater, Bock).

Methodik.

Es wurde die *Apparatur* zur gleichzeitigen Registrierung von Druck und Volumen nach Neuroth-Wezler benutzt. Die Präparate wurden mit Vorhof hergestellt. In einem Teil der Versuche wurde um den Vorhof eine leichte Umschnürung angelegt. Damit sollte das Undichtwerden der Atrioventrikularklappen verhindert werden. Es wurden sowohl Ran. Temp. wie Ran. Esc. benutzt. Die Versuche erstreckten sich über zwei Jahre und wurden zu allen Jahreszeiten durchgeführt. Grundsätzlich war der *Versuchsablauf* folgender:

Das völlig entleerte Herz wurde Überlastungsdrucken von 0—32 cm H_2O ausgesetzt. Dabei wurde außen und innen Tyrodelösung verwandt. Dann wurde das Herz wieder völlig entleert und zum zweitenmal Drucken von 0—32 cm H_2O ausgesetzt, wobei das Pharmakon der Tyrodelösung zugegeben wurde, die in die mit der Herzkammer in Verbindung stehende Kanüle floß. Nach erneutem völligen Entleeren wurde das Herz zum dritten Mal denselben Belastungsdrucken ausgesetzt, aber nur mit Tyrodelösung ohne Pharmakon. Bei jedem Überlastungsdruck wurde anfangs abwechselnd isotonisch und isometrisch registriert. Als es sich herausstellte, daß sich die Bedingungen der Isometrie ungünstig auf den Verlauf der Versuche auswirkten, wie auch neuerdings durch Bauereisen nachgewiesen wurde, ließen wir die Herzen nur noch isotonisch arbeiten. Jedes andere Vorgehen wird besonders vermerkt.

Es wurden untersucht: Coffein, Theophyllin, Paraxanthin, Theobromin, Oxyäthyltheophyllin und Oxyäthyltheobromin.

Die Zahlenangaben auf den Tabellen sind immer Mittelwerte aus 6—10 Versuchen. Sie beziehen sich nur auf Versuche mit Rana Temp.

Ergebnisse.

I. Leerversuche mit Tyrode.

Läßt man ein isoliertes Froschherz mit Tyrodelösung gegen steigenden Überlastungsdruck mehrmals hintereinander schlagen, so kann man schon beim zweiten Mal eine Veränderung der Gleichgewichtskurven feststellen, und zwar nimmt durchschnittlich die Anfangsfüllung um 4% zu, das Schlagvolumen um 10% ab und das Restvolumen um 44% zu (bezogen auf den 1. Wert). Die Frequenzabnahme beträgt 27%. Dieses sind also die Veränderungen, die bei isolierten, spontan schlagenden Herzen eintreten; man muß sie bei der Wirkung der Pharmaka unbedingt berücksichtigen.

Abtrennung des Vorhofs und ebenso *künstliche Reizungen*, aber auch nur leichte Umschnürung an der Vorhof-Kammergrenze bei gleichbleibender Spontan-Frequenz *bewirken einen* grundsätzlich *anderen Verlauf der Gleichgewichtskurven* (worüber wir besonders berichten wollen). Die Ergebnisse, die unter solchen Bedingungen gewonnen wurden, sind mit unseren und sonstigen — wenn auch mit anderer Methodik — an spontan schlagenden Herzen erhaltenen, nicht zu vergleichen.

Tabelle 1.

Veränderung von Anfangsfüllung (AF), Schlagvolumen (VS), Restvolumen (RV) und Frequenz (Fr) nach 2maliger Belastung bis 32 cm H_2O in Tyrode mit und ohne Vorhof in Prozent gegenüber dem 1. Wert.

	AF	VS	RV	Fr.
1. mit Vorhof	+ 4%	— 10%	+ 44%	— 27%
2. ohne Vorhof	— 4%	+ 32%	— 40%	— 32%

Die Tab. 1 zeigt eindeutig, daß die *Gleichgewichtskurven durch Umschnüren des Vorhofs* nicht nur quantitativ sondern *auch qualitativ verändert werden*, auch wenn, wie das bei diesen Versuchen der Fall ist, das

Herz ohne Störung spontan weiterschlägt. Bei der künstlichen Reizung liegen die Veränderungen in derselben Richtung, wie wir sie bei der Umschnürung beobachteten, sind aber ausgeprägter. So sehen wir im Anfang bei künstlicher Reizung nie ein Restvolumen. Wenn man das Herz mit Vorhof höheren Belastungsdrucken aussetzt und der Vorhof sich dabei durch Undichtwerden der Atrioventrikularklappen füllt, kann man häufig dieselben Veränderungen beobachten wie nach leichter Umschnürung des Vorhofs. Diese Tatsachen sind vorerst in diesem Zusammenhang nur deshalb wichtig, weil sie zeigen, welch *großen Einfluß die Versuchsbedingungen* auf *die Gleichgewichtskurven* haben. Dadurch läßt sich schon ein Teil der vorhandenen Widersprüche klären, denn mindestens die Hälfte der früheren Untersuchungen wurde an künstlich gereizten Herzen oder mit partieller Ausschaltung der supraventrikulären Herzteile vorgenommen. Es ergibt sich aber auch daraus, daß in jeder Versuchsreihe *jeweils nur* die *zugehörigen Nullwerte als Vergleichsbasis verwendet werden dürfen.*

II. Coffein-Versuche.

Abb. 1 zeigt isotonische Kontraktionskurven eines Herzens einer Ran. Temp. in Tyrode und mit Zusatz von Coff. natr. benz. 1:40000 bei Überlastungsdrucken von 9, 17 und 32 cm H_2O. Man sieht die Steigerung des Schlagvolumens unter Coffein; die Verminderung der Anfangsfüllung kann man leider nicht aus den Kurven ablesen, da die Nullinie aus registriertechnischen Gründen nach oben oder unten verschoben werden mußte. Die Abnahme der Frequenz kann man direkt aus den Kurven

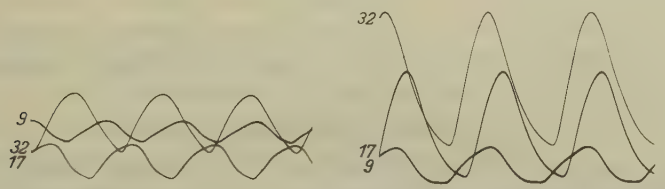


Abb. 1. Isotonische Kontraktionskurven bei 9, 17 und 32 cm H_2O Belastung in Tyrode und mit Coff. nat. benz. 1:40000. Zeit: 1 sec = 1,3 cm.

ersehen. Am deutlichsten wird aber die Wirkung des Coffeins auf der Tab. 2. Dabei ist besonders zu beachten, daß bei einer Konzentration des Coffeins von 1:4000 die Anfangsfüllung so stark (— 26%) vermindert ist, daß man darin schon das Zeichen einer beginnenden Kontraktur sehen kann. Die Abnahme der Frequenz beträgt unter Coffein nur 10—15% gegenüber 27% unter Tyrode. Bei umschnürtem Vorhof beträgt dagegen die Abnahme 23%. Unsere zahlreichen Versuche mit Coffein im Sommer und Winter zeigten auch einen deutlichen jahreszeitlichen Einfluß. Da im Sommer die Minima der Kurven im allgemeinen flacher und mehr nach

rechts verlaufen (Anfangsfüllung größer), ist der Einfluß des Coffeins mit seiner Linksverschiebung ausgesprochener. Der Tyrodeversuch nach dem Coffein zeigte meist wieder die Werte der ersten Belastung mit Tyrode, was einer geringen Steigerung des Schlagvolumens und damit einer Nachwirkung des Coffeins gleichkommt. Die isometrischen Maxima nahmen unter Coffein nicht zu, nur die Anfangsspannung wurde erhöht.

Taballe 2.

Veränderungen von AF, VS, RV und Fr. nach Coffein 1:40000 und 1:4000 gegenüber dem 1. Wert mit Tyrode in Prozent.

1:40000	AF	VS	RV	Fr.
1. mit Vorhof	— 2%	+ 7%	—25%	—15%
2. ohne Vorhof	+ 1%	+36%	—22%	—23%
1:4000				
mit Vorhof	—26%	+ 4%	— 7%	—10%

III. Paraxanthin-Versuche.

Paraxanthin wirkt praktisch wie Coffein, d. h. es verursacht Abnahme der Anfangsfüllung, Zunahme von Schlagvolumen und Frequenz (Tab. 3). Diese Wirkung beobachtet man immer bei einer Verdünnung 1:10000. Bei 1:40000 ist die Wirkung unsicher, wenn auch manchmal deutlich zu sehen.

Tabelle 3.

Veränderung von AF, VS, RV und Fr. nach Paraxanthin 1:10000 in Prozent gegenüber dem 1. Wert mit Tyrode.

	AF	VS	RV	Fr.
1. mit Vorhof	—7%	+ 8%	—40%	—10%
2. ohne Vorhof	+8%	+54%	—19%	—20%

IV. Versuche mit Oxy-äthyl-Theobromin.

Die Wirkung von Oxyäthyltheobromin auf Schlagvolumen, Restvolumen und Frequenz verhält sich so wie die von Coffein und Paraxanthin (Tab. 4). Im Gegensatz zu diesen beiden nimmt die Anfangs-

Tabelle 4.

Veränderung von AF, VS, RV und Fr. nach Oxy-äthyl-Theobromin 1:40000 in Prozent gegenüber dem 1. Wert mit Tyrode.

	AF	VS	RV	Fr.
1. mit Vorhof	+2%	+10%	—18%	—20%
2. ohne Vorhof	+2%	+22%	—69%	—16%

füllung aber nicht ab, sondern zu. In dieser Hinsicht verhält es sich wie das Oxyäthyltheophyllin. Abb. 2 zeigt isotonische Kontraktionskurven

unter Tyrode und Oxyäthyltheobromin 1:40000 bei den gleichen Belastungshöhen. Dabei sieht man, daß besonders bei den niedrigen Drucken die Schlagvolumenzunahme ausgesprochen ist. Leider liegen keine Versuche mit Theobromin pur. vor; vermutlich werden sie aber denselben Unterschied zeigen, den wir nun bei der Beschreibung der Versuche mit Theophyllin pur. und Oxyäthyltheophyllin deutlich machen können.

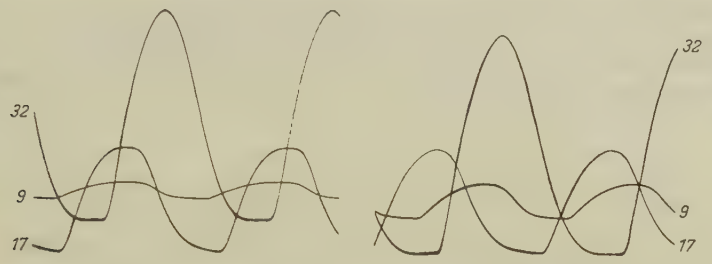


Abb. 2. Isotonische Kontraktionskurven bei 9, 17 und 32 cm H_2O Belastung in Tyrode und mit Oxyäthyltheobromin 1:40000. Zeit: 1 sec = 1,3 cm.

V. Versuche mit Theophyllin. pur. und Substituenten.

Bei den Untersuchungen mit Theophyllin verwandten wir verschiedene Präparate, nämlich Theophyllin purum, Neutraphyllin und Oxyäthyl-Theophyllin (Cordalin). Das *Theophyllin purum* ist in seiner Wirkung nur graduell vom Coffein und Paraxanthin verschieden. Erst durch die *Einführung einer Oxyäthylgruppe* — wobei es sicher nicht gleichgültig ist, wo dieselbe eingeführt wird — wird es nicht nur sehr viel besser löslich, sondern auch wirksamer. Die Schlagvolumenzunahme wird doppelt so groß als unter Theophyllin. purum, und gleichzeitig wird die *Anfangsfüllung nicht geringer, sondern größer.* Die Wirkung auf die Frequenz, die in derselben Richtung liegt wie bei Coffein und Paraxanthin (geringere Abnahme als unter Tyrode (27%)), ist ebenfalls nur ausgeprägt vorhanden, wenn der Vorhof am Präparat ist.

Tabelle 5.

Veränderung von AF, VS, RV und Fr. nach *Theophyllin. purum* 1:30000 (mit Vorhof) in Prozent gegenüber dem 1. Wert mit Tyrode.

	AF	VS	RV	Fr.
	— 4%	+ 7%	+ 2%	— 22%
Oxy-äthyl-Theophyllin 1:30000 (Cordalin)				
1. mit Vorhof	+ 13%	+ 15%	+ 15%	— 4%
2. ohne Vorhof	+ 9%	+ 76%	— 54%	— 33%

Abb. 3 zeigt isotonische Kontraktionskurven unter Tyrode und *Oxyäthyltheophyllin* bei den gleichen Belastungsdrucken. Wir sehen hier *bei allen Belastungsdrucken eine beträchtliche Zunahme des Schlagvolumens.*

Es gibt also eine eindeutige Wirkung der Purine auf die Dynamik des isolierten Froschherzens, wenn man alle Faktoren, auch die für die Ausgangslage wichtigen, berücksichtigt. Bei Durchsicht der Versuche konnte ein jahreszeitlicher Einfluß nicht übersehen werden, und zwar liegen die Minima während der warmen Jahreszeit mehr nach rechts (AF größer), in der übrigen Zeit sind sie mehr nach links verschoben.

Es werden von verschiedenen Untersuchern Zain, Kisch, König jahreszeitliche Einflüsse auf die Empfindlichkeit gegen O_2-Mangel, Magnesiumsalze und Wirksamkeit der Glucose am isolierten Froschherzen beschrieben, die vielleicht einen inneren Zusammenhang mit den jahreszeitlichen Veränderungen der Gleichgewichtskurven haben. Die Wirksamkeit der Purine wird jahreszeitlich nur quantitativ beeinflußt.

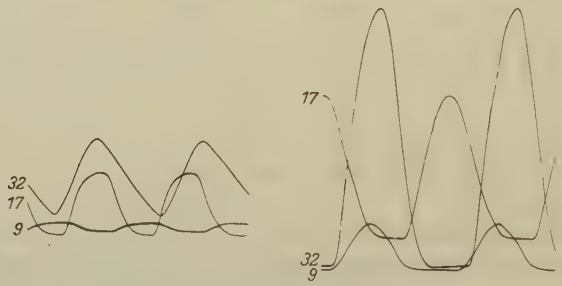


Abb. 3. Isotonische Kontraktionskurven bei 9, 17 und 32 cm H_2O Belastung in Tyrode und mit Oxyäthyltheophyllin 1:30000. Zeit: 1 sec = 1,3 cm.

Sehr deutlich wurde auch die relative Unempfindlichkeit der Herzen von Rana *esculenta* gegenüber den Purinen, die ebenfalls immer beschrieben wird (Bock). Deshalb haben wir bei der Aufstellung der Tabellen nur die Versuche mit Rana *Temp.* verwertet.

Für die *eindeutige Wirkung auf die Minima und Maxima der Gleichgewichtskurven* bringt Abb. 4 ein Beispiel. Sie zeigt das Verhalten der Gleichgewichtskurven unter Coffein 1:40000 und Oxyäthyltheophyllin 1:30000 im Vergleich zu Tyrode nach zweimaliger Belastung bis 32 cm H_2O. In beiden Fällen wird die Leistung gesteigert, d. h. das Pulsvolumen vermehrt, und zwar einmal durch Verminderung des Restvolumens oder auch durch Steigerung der Anfangsfüllung, was aber nur bei den Purinen mit einer Oxyäthylgruppe zu finden ist. Die dargestellten Versuche zeigen die Veränderung der Gleichgewichtskurven besonders ausgeprägt. Man ist aber berechtigt, dies als die spezifische Wirkung zu bezeichnen, da die Ergebnisse der zahlreichen übrigen Versuche, nur quantitativ, je nach Ausgangslage, variieren.

Besprechung der Ergebnisse.

Dreser fand 1887 bei *Coffein* natr. benz. bei spontanem Schlagen eine Steigerung der absoluten Kraft. O. Frank, der aus verschiedenen Gründen die Angaben von Dreser nachprüfte, fand bei derselben Konzentration und umschnürtem Vorhof eine geringere Steigerung der absoluten Kraft als Dreser und erklärte diese

verbesserte Leistung, das heißt die Vergrößerung des Pulsvolumens, nur durch die Frequenz*ab*nahme. Die weiteren Untersucher, wie Cushny (1901), Symes (1918), Junkmann (1925), Langecker (1925) und andere, fanden dagegen eine Frequenz*zu*nahme und machten diese für die Leistungssteigerung verantwortlich. Sanders (1927), Eismayer und Quincke (1928) und Preobraschenski (1927), die im Gegensatz zu den vorher erwähnten am künstlich gereizten Herzen keine Leistungssteigerung und keine Wirkung auf die Anfangsfüllung fanden, arbeiteten auch mit größeren Konzentrationen. Nach dem früher Gesagten läßt sich diese Diskrepanz durch das Verhalten der Gleichgewichtskurven bei spontanem Schlagen mit Vorhof, oder bei spontanem Schlagen mit umschnürtem Vorhof, oder bei künstlicher Reizung, hinreichend erklären.

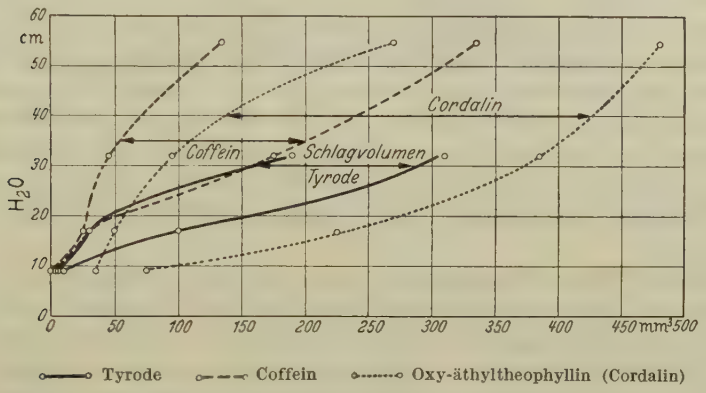


Abb. 4. Kurven der isotonischen Minima und Maxima im Druck-Volum-Diagramm von je einem Versuch mit Tyrode, Coffein natr. benz. 1:40000 und Oxyäthyltheophyllin 1:30000.

Über die Wirkung von *Theobromin, Theophyllin* und *Paraxanthin* gibt es wenig Angaben; „es ist eine Lücke in dem definitiven Beweis über die Wirkung dieser Drogen auf das Froschherz, besonders im Hinblick auf Theobromin und Theophyllin" (Bock).

Auf Grund unserer Versuche *können wir über die Wirkung der Purine*, einschließlich Theophyllin und Theobromin, *folgende Aussagen machen*: Die optimale Wirksamkeit liegt bei einer Konzentration von 1:20000 bis 1:40000 sowohl für Coffein als auch für Paraxanthin, Theobromin und Theophyllin. Coffein und Paraxanthin und Theophyllin pur. zeigen eine Verschiebung der Minima nach links (Verkleinerung der Anfangsfüllung), dabei Zunahme des Schlagvolumens durch Verringerung des Restvolumens und verhindern das Absinken der Frequenz. Sie scheinen damit den Insuffizienzerscheinungen, hervorgerufen durch die Isolierung des Herzens: nämlich Zunahme der Anfangsfüllung, Abnahme des Schlagvolumens und Abnahme der Frequenz, entgegenzuwirken. Bei den *Purinen mit einer Oxyäthylgruppe* kommt es dagegen zu einer *Zunahme der Anfangsfüllung*. Das *Schlagvolumen* nimmt dabei aber auch sehr viel

stärker zu. Wenn bei hoher Konzentration die Zunahme der Anfangsfüllung nicht so ausgeprägt ist, dann fehlt auch die stärkere Zunahme des Schlagvolumens.

Stärkere Anfangsfüllung ist aber — auch nach Kochmann und de Veer — keineswegs immer mit Vergrößerung der Amplitude verbunden (das sieht man auch deutlich bei der Wirkung von Acetylcholin).

Die Wirkung der Purine zeigt sowohl bei Verminderung der Anfangsfüllung (Coffein) wie bei Zunahme der Anfangsfüllung (Oxyäthyltheophyllin) (*also sowohl bei Ab- als auch bei Zunahme der Anfangsspannung*) *eine Zunahme des Schlagvolumens.* Dies ist ein *weiterer Beweis dafür, daß* auch am isolierten Kaltblüterherzen *das* Straub-Starlingsche *Gesetz nicht gilt*, welches als notwendige Voraussetzung für ein vergrößertes Schlagvolumen eine Zunahme von Anfangsfüllung oder Anfangsspannung fordert.

Die Pharmaka wirken also zumindest am isolierten Froschherzen nicht so, daß sie die für jenes „Gesetz" notwendigen mechanischen Voraussetzungen schaffen, sondern bewirken die Verbesserung auf andere Weise, *offenbar durch direkte oder indirekte Beeinflussung der „kontraktilen Elemente"*. Die lokal-nervösen Apparate des Herzens sind dabei von Wichtigkeit.

Unserer früheren Feststellung, daß die *Kurve der isotonischen Minima* des spontan schlagenden Herzens gegenüber der *„Ruhedehnungskurve"* nach rechts verschoben ist, kommt deshalb besondere Bedeutung zu, weil wir gegenüber O. Frank und anderen Untersuchern, die nur fanden, daß diese beiden Kurven nicht zusammenfallen, Angaben über Größe und *Richtung dieser Verschiebung* machten.

Der von Reichel uns zugeschriebene Schluß, daß das Herz während der Tätigkeit seine rein elastischen Eigenschaften ändere, weil es während der Kontraktion „weicher" wird, ist von uns nicht gezogen worden. Wenn wir diese Verschiebung nach rechts unter Übernahme bisher gebräuchlicher Bezeichnungen mit „Tonusabnahme" oder „Zunahme der Dehnbarkeit" oder auch „Weicherwerden" beschrieben, so war damit keine Aussage über den Anteil gemacht worden, den die plastischen und elastischen Elemente daran haben. Zwar läßt sich über ein biologisches Objekt beschränkt eine Aussage im physikalischen Sinn, z. B. über seine Elastizität, machen. Dies bedeutet jedoch nicht, daß damit die physiologischen Eigenschaften hinreichend beschrieben sind. Dieses offenbart sich z. B. auch, wenn man die Wirkung der Purine auf die Dynamik des isolierten spontan schlagenden Herzens zu beschreiben versucht. Die „Ruhedehnungskurve" wird offensichtlich nicht von den Purinen beeinflußt, das heißt, die physikalischen Eigenschaften, soweit sie durch die „Ruhedehnungskurve" dargestellt werden, sind durch die Pharmaka nicht verändert, wohl aber die physiologischen Eigenschaften, die in der Kurve der isotonischen Minima zum Ausdruck kommen.

Die Versuche zeigen, daß in den angewandten Konzentrationen die Purine die *Kurve der Minima* nach links verschieben, welches „Tonuszunahme" oder „Abnahme der Dehnbarkeit" oder „Härterwerden" bedeutet, aber auch darin liegt keine Aussage, inwieweit die elastischen oder plastischen Eigenschaften des Herzmuskels daran beteiligt sind. Eine Umkehr dieser Wirkung kommt durch die Einführung einer Oxyäthylgruppe in das Molekül zustande.

Die beiden letzten Diagramme (Abb. 5 und 6) machen nun noch einmal übersichtlich die Wirkung der Purine auf das isolierte Froschherz deutlich; man ersieht daraus:

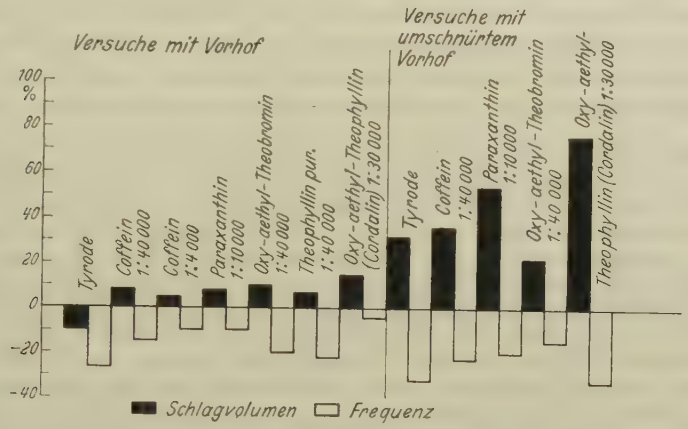


Abb. 5. Veränderung von Schlagvolumen und Frequenz in Prozent nach zweimaliger Belastung bis 32 cm H_2O mit Tyrode und verschiedenen Purinen.

Abb. 6. Veränderung der Anfangsfüllung in Prozent nach zweimaliger Belastung bis 32 cm H_2O mit Tyrode und verschiedenen Purinen.

1. eine Vergrößerung des Schlagvolumens (Pulsvolumen);
2. eine Verminderung der Anfangsfüllung („Dehnbarkeit");
3. eine Frequenzbeschleunigung.

Die *Zunahme des Schlagvolumens* ist eindeutig bei allen Purinen nachweisbar, wenn auch nicht quantitativ gleich (besonders je nach dem Einfluß des Vorhofs). Coffein, Paraxanthin und Theophyllin pur. bewirken größenordnungsmäßig dieselbe Steigerung, wenn man Paraxanthin 4mal so hoch dosiert wie die beiden übrigen. Oxyäthyltheophyllin (Cordalin) und Oxyäthyltheobromin vergrößern das Schlagvolumen bedeutend

stärker als ihre nicht substituierten Moleküle; daher liegt die Annahme nahe, daß die Veränderung dieser Purine durch die Oxyäthylgruppe dafür verantwortlich zu machen ist. Nach Umschnüren des Vorhofes beobachtet man eine noch stärkere Zunahme des Schlagvolumens durch die Purine. Sie müssen also auch einen unmittelbaren Angriffspunkt an der Muskulatur haben, wie schon Bacq und Frederiq aus der typischen Leistungssteigerung am curarisierten Froschmuskel geschlossen haben.

Daß die früheren Untersucher in ihren Ergebnissen nichts über den *Einfluß der Purine auf die Anfangsfüllung* („Dehnbarkeit") aussagen, liegt daran, daß mit der von ihnen verwendeten Methode an tätigen Herzen die Anfangsfüllung nicht einwandfrei registriert werden konnte. Soweit die Untersucher hierüber Aussagen machen, haben sie durchweg, wie z. B. Eismayer und Quincke, nur die Wirkung auf die tatsächliche „Ruhedehnungskurve" beobachtet. Sie finden dieselbe unbeeinflußt, was aber keineswegs berechtigt, den Schluß zu ziehen, daß sich die isotonischen Minima ebenso verhalten wie die Ruhedehnungskurven. So scheint es auch fragwürdig, ob die Wirkung von Vagus und Sympathicus an Herzen „in situ", und zwar auf *seine Anfangsfüllung* (Dehnbarkeit) noch vorhanden ist, wenn man in situ den Vorhof durch Einfüllen von Agar-Agar überdehnt und das spontane Schlagen verhindert, von außen mit einer Spritze beliebig füllt, das Herz künstlich reizt und die entstehende Aktion nur *isometrisch* registriert wie Bauereisen und Reichel. Bei einem solchen Verfahren sind die Vorteile des Verbleibens des Herzens „in situ" gegenüber dem isolierten spontan schlagenden Herzen nur in der Verbindung mit den Herznerven gegeben, die aber wegen der besonderen Umstände ihre Wirkung nur gering oder gar nicht entfalten können.

Eine Frage für sich ist, ob man der Veränderung der eigentlichen „Ruhedehnungskurve" (ein Zustand, der bei den Herzen in situ nie vorkommt) mehr Gewicht beilegt als dem Verhalten der isotonischen Minima. Letztere zeigen jedenfalls unter der Wirkung der nicht substituierten Purine eine Beeinflussung der Herzen mit Vorhof in der Richtung, daß bei gleichem Druck die Anfangsfüllung (also die „Dehnbarkeit") abnimmt. Bei Coffein 1:4000 sieht man sogar schon die Zeichen einer beginnenden Kontraktur sich ausbilden. Die beiden Versuchsreihen mit unbeeinflußtem und andererseits mit leichter Umschnürung um den Vorhof lassen aber den *Schluß zu, daß diese verminderte Anfangsfüllung (Dehnbarkeit) über das Reizbildungszentrum (supraventrikuläre Herzteile) ausgelöst wird*, denn bei den Versuchen mit leichter Umschnürung beobachtet man keine verminderte Anfangsfüllung. Es könnte sich dabei natürlich auch um eine Wirkung direkt auf den Muskel handeln, die unter besonderen Umständen durch das Reizbildungszentrum unterdrückt würde. *Oxyäthyltheophyllin* und *Oxyäthyltheobromin* unterscheiden sich gegenüber den nicht substituierten Purinen im wesentlichen dadurch, daß sie eine *vermehrte Anfangsfüllung zeigen*. Man könnte versucht sein, dieses Verhalten auf die Tatsache zurückzuführen, daß bei diesen beiden Substanzen das Schlagvolumen sehr stark vergrößert, also die Kontraktion verstärkt ist, und daß deshalb — im inneren Zusammenhang damit — die

Anfangsfüllung (Dehnbarkeit) sich verändert. Diese Frage müssen wir offen lassen. Der früher erwähnte „Weichmachereffekt" ist generell also nach den bisher vorliegenden Erfahrungen nur bei den Purinen mit Oxyäthylgruppen nachzuweisen.

Die bisher bestehenden Unklarheiten über die *Wirkung* der Purine *auf die Frequenz* lassen sich unseres Erachtens eindeutig durch die Unterschiede der Methode (besonders auch hinsichtlich des Vorhofeinflusses) und das Außerachtlassen der Veränderung erklären, die schon ohne jedes Pharmakon durch die Isolierung selbst, gleich unter welchen Bedingungen, eintritt. Durch die Isolierung nimmt die Frequenz im Einzelfalle bis zu 50% und mehr ab (im Mittel um 27%), so daß eine Abnahme der Frequenz unter Einwirkung der Purine um nur 5—20% praktisch einer Frequenzbeschleunigung durch das Pharmakon gleichkommt. Diese kann man besonders gut beobachten, wenn man das Coffein sofort gibt, danach Tyrode und dann wieder Coffein. Diese Wirkung ist aber, wie nochmals betont sei, nur deutlich vorhanden bei den Versuchen *mit* Vorhof, ohne jede Umschnürung. Die Beschleunigung der Pulsfrequenz, die von allen Purinen hervorgerufen wird, beruht also auf einer Wirkung auf die beschleunigenden *nervösen* Apparate des Herzens und nicht auf einer direkten Wirkung auf die *muskulären excitomotorischen* Apparate des Herzens.

Zusammenfassung.

1. Die uneinheitlichen Ergebnisse früherer Untersucher werden zum Anlaß für neue Untersuchungen über die Wirkung der Purine auf das isolierte spontan schlagende Froschherz genommen, mit der von uns modifizierten Methode zur Druck-Volum-Registrierung nach Frank.

2. Die Ergebnisse sind: Coffein 1:40000, Paraxanthin 1:10000 und Theophyllin. pur. 1:40000 bewirken Abnahme der Anfangsfüllung, Zunahme des Schlagvolumens, Abnahme des Restvolumens und Frequenzzunahme.

Oxyäthyltheophyllin 1:30000 und Oxyäthyltheobromin 1:40000 haben eine stärkere Zunahme des Schlagvolumens bei vergrößerter Anfangsfüllung zur Folge.

3. In der Diskussion unserer Befunde im Zusammenhang mit den Ergebnissen früherer Untersucher wird der größere Teil der Diskrepanzen durch die verschiedenen Untersuchungsmethoden geklärt. Von größter Wichtigkeit für den Verlauf der Gleichgewichtskurven ist, ob die Versuche an Herzen mit oder ohne supraventrikuläre Herzteile oder bei künstlicher Reizung angestellt werden. Bei Beobachtung aller für die Ausgangslage wichtigen Bedingungen ist die Wirkung der Purine *eindeutig*.

Literatur.

Bacq and Frédericq: J. of Physiol. **90**, 55 (1937). — Bauereisen, E.: Z. Biol. **105**, 4, 293 (1952). — Bock: Die Purinderivate. Heffters Hdb. d. exp. Pharmak. II/**1**, 508 (1920). — Bruns: Dtsch. Arch. klin. Med. **113**, 179 (1913). — Bülbring, E.: Arch. exper. Pharmakol. u. Path. **152**, 257 (1930). — Cushny u. Naten: Arch. internat. Pharmacodynamie **9**, 169 (1901). — Dreser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **24**, 221 (1887). — Eichholtz u. Staab: Klin. Wschr. **30**, 97 (1952). — Eismayer, H., u. H. Quincke: Z. Biol. **88**, 139 (1928); **89**, 523 (1930). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **140**, 340 (1929); **139**, 303 (1929); **137**, 362 (1928). — Frank, O., u. Weinland: Sitzb. f. Morph. u. Physiol. XV, **154** (1899). — Filene, W.: Arch. f. Anat. u. Physiol. **80** (1886). — Haas, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 589 (1943). — Heathcote, R. St. A.: J. of Pharmacol. **16**, 327 (1920/21). — Hendrych: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **182**, 738 (1936). — Junkmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **96**, 63 (1925). — Kzawa, S.: J. of Physiol. **49**, 233 (1914/15). — Kjellberg, S. R., Rudha and T. Sjöstrand: Acta Physiol. Scand. **24**, 49 (1951). — Kisch, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **137—38**, 116 (1928). — Kochmann, M., u. A. de Veer: Z. exper. Med. **33**, 502 (1923). — Kuhn, W., u. B. Hargitay: Experientia **7**, Fasc. 1/1 (1951). — König, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **126**, 129 (1927). — Langecker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **106**, 1 (1925). — Müller, A. H.: Z. exper. Med. **71**, 186 (1930); **55**, 226 (1927). — Neuroth, G., u. K. Wezler: Pflügers Arch. **255**. 93 (1952). — Preobraschenski: Z. exper. Med. **71**, 49 (1930); **35**, 1/2 (1927). — Reichel, H.: Erg. Physiol. **47**, 469 (1952). — Segall and Anrep: Heart **13**, 61 (1926). — Sanders: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **125**, 358 (1927). — Schäfer, H.: Exper. d. Physiol. **46**, 71 (1950). — Schumann, H.: Der Muskelstoffwechsel des Herzens 1950. — Symes: J. of Physiol. **1918/19**. — Sulzer, R.: Untersuchung über den diast. Tonus, Diss. Zürich. — Unna u. Winniwater: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 163 (1937). — Weizsäcker: Dtsch. Arch. klin. Med. **133**, 1 (1920). — Zain: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 605 (1939).

Prof. Dr. K. Wezler, Inst. für animalische Physiologie der Univ. Frankfurt a. M.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 391—397 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Entzündungshemmung durch Eisenpräparate.

Von

MARTIN KRAMER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. Juni 1953.)

I.

Beobachtungen eines Arztes, der an Patienten ein schnelleres Abklingen von Entzündungserscheinungen nach Injektion eines zweiwertigen Eisenpräparates festgestellt hatte, waren der Anlaß zu experimentellen Untersuchungen über entzündungshemmende Eigenschaften verschiedener Eisenverbindungen.

Es erschien wünschenswert, einige andere Eisenverbindungen, besonders auch therapeutisch verwendete, auf entzündungshemmende Eigenschaften zu untersuchen.

In der reichhaltigen Eisenliteratur ist gerade über dieses Problem wenig bekannt. 1924 untersuchten W. F. PETERSEN und R. H. JAFFÉ den Übertritt von intravenös injiziertem Hämoglobin in die Lymphe an der Ductus thoracicus-Fistel. Sie stellten fest, daß die durch einen Serumschock hervorgerufene Beschleunigung des Farbstoffübertritts durch Injektion von kolloidalem Eisen wieder aufgehoben werden konnte. Sie führten diesen Effekt auf eine gefäßabdichtende Wirkung des Eisenkolloids im Pfortaderkreislauf zurück. H. EPPINGER, J. FALTITSCHECK, H. KAUNITZ und H. POPPER fanden eine Abschwächung der Symptome einer Allylformiatvergiftung an Hunden nach Behandlung mit Ferrum oxydatum saccharatum. J. BÖCK, H. KAUNITZ und H. POPPER beschrieben eine Verzögerung des Flouresceinübertritts in das Kammerwasser des Kaninchens nach intravenöser Injektion desselben Präparats. G. SCHNEIDER stellte am isolierten Kaninchenohr, dessen Gefäßdurchlässigkeit vorher durch Allylformiat erhöht wurde, eine signifikante Verminderung des entstehenden Ödems bei Durchströmung mit kolloidalem Eisenhydroxyd gegenüber Kontrollversuchen fest. Versuche mit vorheriger Gefäßschädigung durch Histamin ergaben keine so eindeutigen Ergebnisse.

II. Versuche mit einer Ferrosulfat-Ascorbinsäurelösung.*

Benutzt wurde eine 5%ige Ferrosulfatlösung, der 5% Ascorbinsäure zur Stabilisation beigegeben war. In geringerer Konzentration ist ein solches Gemisch mit einer mengenmäßig von der Firma Nordmark nicht definierten Beimengung von Cystein unter dem Warenzeichen „Ce-Ferro" im Handel. Einige Untersuchungen wurden an der Senfölchemosis des Kaninchenauges durchgeführt, alle anderen an der von H. SELYE zuerst beschriebenen Eiklarhyperergie der Ratte.

a) Versuche an der Senfölchemosis.

5 Kaninchen wurden 5 mg Eisen in der oben beschriebenen Lösung langsam in die Ohrvene injiziert, 2 Std später diesen Tieren und weiteren 4 Kontrolltieren je 2 Tropfen Senföl in den Bindehautsack des einen Auges geträufelt. Die sich entwickelnde Chemosis zeigte in Intensität und Dauer bei den Versuchstieren keinerlei Unterschied im Vergleich mit den Kontrolltieren. In einer zweiten Versuchsreihe mit 8 Tieren wurden zunächst allen Tieren 2 Tropfen Senföl in den Bindehautsack eines Auges instilliert; 2 Std später, als eine Chemosis sich bereits deutlich ausgebildet hatte, bekamen 4 Tiere 10 mg Fe je Kilogramm der gleichen Lösung intravenös. Anschließend an die Injektion wurde eine leichte narkotische Wirkung, bei 2 Tieren bis zum Wegfall der Stellreflexe beobachtet, die jedoch nach wenigen Minuten vorüberging. Intensität und Dauer der Senfölchemosis blieben wiederum unbeeinflußt. Ein Tier starb 36 Std nach Applikation der Ferrosulfatlösung. E. Starkenstein injizierte 20 und 40 mg Fe als Ferrosulfat pro Kilogramm, Sabbatani 22 mg pro Kilogramm, an Kaninchen intravenös mit Todesfolge.

b) Versuche an der Eiklarhyperergie der Ratte.

In dieser Versuchsreihe wurde die von J. Leger, G. Masson und G. L. Prado sowie E. Eichenberger, M. Schmidthauser und G. Rufener als optimal ermittelte Dosis von 0,5 cm^3 frischem Eiereiweiß intraperitoneal appliziert und alle 60 min die Intensität der Reaktion in 4 Graden geschätzt:

0 Keine Reaktion.
1 Rötung, schwaches Ödem nur der Vorder- oder Hinterextremitäten.
2 Mittleres Ödem meist nur der Extremitäten.
3 Starkes Ödem der Extremitäten, Schnauze und eventuell Penis oder Klitoris.
4 Extrem starkes Ödem der Extremitäten, Schnauze, Zunge, Penis oder Klitoris.

Die Schätzungen des Ödemgrades wurden ausschließlich von mir vorgenommen. Da nach den Erfahrungen der oben genannten Autoren die Reaktionen der einzelnen Tiere bei wiederholten Eiklarinjektionen unregelmäßig sind, wurden entweder alle Versuchstiere nur einmal benutzt oder gelegentlich nach einem 10tägigen Intervall ein zweites Mal, nach dem beobachtet worden war, daß nach diesem Zeitraum die Ödeme mit sogar noch größerer Regelmäßigkeit auftraten.

An insgesamt 72 nicht vorbehandelten Tieren wurden Kontrollversuche durchgeführt. Die Durchschnittswerte aller dieser Kontrolltiere werden im folgenden jeweils zum Vergleich mit den Versuchstieren herangezogen, da es sich herausstellte, daß wesentliche Unterschiede bei den einzelnen Gruppen nicht bestanden. Insgesamt fanden sich 9 Ödemversager, das sind ~13%, was den Erfahrungen anderer Autoren entspricht. Es wurde die Beobachtung gemacht, daß trächtige Ratten keine Ödeme bekamen. Die Angaben von J. Leger, G. Masson und J. L. Prado, die eine geringere Empfindlichkeit weiblicher Tiere beobachteten, können durch eigene Befunde bestätigt werden.

In der ersten Versuchsreihe wurden 10 Ratten 10 mg Fe pro Kilogramm der beschriebenen Ferrosulfatlösung intravenös injiziert und

15 min danach je 0,5 cm³ Eiklar intraperitoneal. Die graphische Darstellung der Ödemintensität zeigt im Vergleich mit der der Kontrolltiere eine fast vollständige Hemmung der Ödembildung.

An der gegebenen Ferrosulfatdosis starben von 14 Tieren 4 direkt im Anschluß an die Injektion, 2 davon unter Krämpfen.

Durch intravenöse Injektion von 10 mg Fe je Kilogramm 1 Std *nach* der Eiklarapplikation konnte die Entstehung des Ödems nicht verhindert werden, sondern es bildete sich in gleicher Weise aus wie bei den Kontrolltieren. Bei dieser Versuchsreihe starben 3 von 13 Tieren an der Dosis.

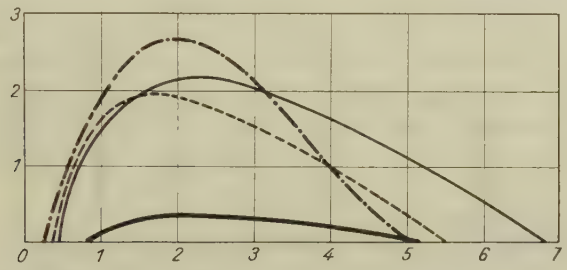


Abb. 1. - - - - - - - Ferrum oxydat. sacch. (15 Tiere); · — · — Ferritrat (6 Tiere); ▬▬ Ferrosulfat und Ascorbinsäure (10 Tiere); ——— Kontrolltiere (72 Tiere). Ordinate = geschätzte Ödemintensität; Abszisse = Zeit in Stunden.

(F. Scheiffharth und G. Berg fanden in Versuchen mit Pyrazolonderivaten eine bessere Beeinflussung des Ödems, wenn sie die entzündungshemmende Substanz nach der Eiklarinjektion injizierten.)

In einer weiteren Versuchsreihe mit 5 mg Fe pro Kilogramm intravenös kurz vor der Eiklarapplikation zeigte sich eine wesentlich geringere Hemmung der Ödembildung. Bei 3 mg Fe je Kilogramm trat gar keine Beeinflussung der Ödembildung mehr auf. Auch an diesen Dosen starben noch einige Tiere.

III. Versuche mit Ascorbinsäure.

Da der verwendeten Ferrosulfatlösung 5% Ascorbinsäure beigegeben waren, was bei der wirksamen Dosis von 10 mg Fe je Kilogramm einer gleichzeitigen Gabe von 50 mg Ascorbinsäure entspricht, war die Frage zu klären, ob diese Dosis Ascorbinsäure allein in der Lage ist, die Ausbildung des Eiweißödems zu hemmen.

Der Versuch wurde an 6 Tieren und an einer gleichen Anzahl von Kontrolltieren so durchgeführt, daß 50 mg Ascorbinsäure pro Kilogramm vor der Eiklarapplikation gegeben wurden. Hierbei zeigte sich keine Wirkung. Bei einer anderen Versuchsreihe, bei der die Versuchstiere 8 Tage vorher jeweils 2mal 50 mg Ascorbinsäure bekommen hatten und am Versuchstage in der üblichen Weise mit der gleichen Dosis vorbehandelt wurden, trat eine deutliche Ödemhemmung ein.

IV. Versuche mit Ferro- und Ferriammonsulfat.

Zum Vergleich zwischen der Wirkung zwei- und dreiwertiger Eisensalze wurden Versuche mit diesen Verbindungen vorgenommen, da im Mohrschen Salz das Eisen in seiner zweiwertigen Form relativ beständig ist. In Lösungen, die 2 mg Fe im Kubikzentimeter enthielten, wurden Dosen von 1 mg Fe je Kilogramm gegeben, da bei 2 mg pro Kilogramm bereits einige Tiere starben. Die intravenöse Injektion der Eisensalzlösungen erfolgte wiederum etwa 15 min vor der Eiklarapplikation. Die Abb. 2 zeigt einen Unterschied zwischen der Wirkung des Ferri- und des

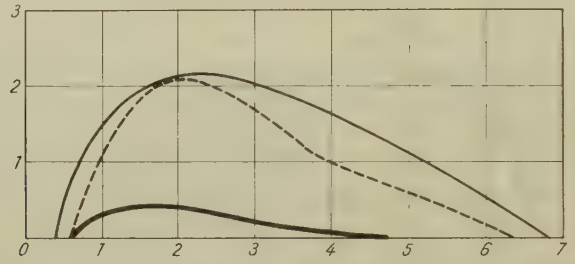


Abb. 2. ——— Ferriammonsulfat (10 Tiere); - - - - - - Ferroammonsulfat (10 Tiere): ——— Kontrollen (72 Tiere).

Ferrosalzes auf die Ödemausbildung. Während das Mohrsche Salz keinen Effekt hatte, wurde durch Eisenammoniakalaun die Ausbildung des Ödems fast völlig unterdrückt.

V. Versuche mit einem stabilisierten Ferrisaccharat („Ferritrat") und Ferrum oxydatum saccharatum.*

Beim Ferritrat handelt es sich um Ferrum oxydatum saccharatum mit einem von der Firma Nordmark in seiner Zusammensetzung und Menge nicht deklarierten Schutzkolloid. Das Präparat enthält nach Angabe der Firma im Kubikzentimeter 20 mg Eisen.

In zwei Versuchsreihen wurden die Dosen 10 und 20 mg Fe je Kilogramm an 5 und 6 Versuchstieren mit der gleichen Anzahl von Kontrolltieren geprüft, wobei es sich herausstellte, daß die Ödembildung in keiner Weise gehemmt werden konnte (Abb. 1). Die im Vergleich zu den bisher angewandten relativ hohen Dosen wurden von den Tieren reaktionslos toleriert.

Da die Zusammensetzung des Ferritrats nicht genau bekannt war, wurden Versuche mit dem offizinellen Ferrum oxydatum saccharatum an 15 Versuchstieren und der gleichen Anzahl von Kontrolltieren durchgeführt. Es wurden 10 mg Fe pro Kilogramm einer Lösung injiziert,

die 0,5% Eisen enthielt. Dabei zeigte sich eine geringe Hemmung der Ödemausbildung (Abb. 1). Toxische Nebenwirkungen wurden auch hier nicht beobachtet.

VI. Versuche mit Irgapyrin.*

Zum Zwecke des Vergleichs mit einer bekannten entzündungshemmenden Substanz wurde das „Irgapyrin" untersucht. Es ist eine Lösung von je 15 g Aminophenazon und 3,5-Dioxo, 1,2-Diphenyl, 4n-butylpyrazolidin-Na in 100 cm^3 Aqua dest. In Versuchen von G. Wilhelmi und R. Domenjoz an der auch von E. Gross angegebenen Methode der Ödembildung an der Rattenpfote sowie von F. Schleiffarth und G. Berg an der Eiklarhyperergie der Ratte erwies sich Irgapyrin als stark entzündungshemmend. In meinen Versuchen wurden, bezogen auf den Aminophenazonanteil, 50 mg je Kilogramm vor der Eiklarapplikation intramuskulär gespritzt. Es zeigte sich eine fast vollständige Hemmung der Ödembildung bei 10 Versuchstieren.

VII. Diskussion.

Die Untersuchungen mit dem Ferrosulfat-Ascorbinsäuregemisch erbrachten bei den beiden geprüften Entzündungsarten einen deutlichen Unterschied in ihrer Wirkung. Während die Senfölchemosis nicht beeinflußt werden konnte, wurde das Eiklarödem der Ratte bei einer Dosis von 10 mg Eisen pro Kilogramm, die allerdings sehr toxisch war, fast völlig gehemmt.

Solche verschiedenen Reaktionen mehrerer Entzündungsarten wurden schon früher bei Untersuchungen über die gefäßabdichtende Wirkung des Calciums beschrieben. R. Chiari und H. Januschke konnten an der Senfölchemosis einen deutlichen Rückgang der Entzündung und G. Rosenow eine Verminderung der Exudatbildung beobachten, wenn er durch Einbringung eines sterilen Kupferdrahtes in die vordere Augenkammer des Kaninchens eine eitrige Entzündung hervorrief. Dagegen zeigte R. Lewy, daß die Ausbildung eines Hydrothorax, der bei Vergiftung von Meerschweinchen mit Diphtherietoxin häufig auftritt, durch Calciumchloridgaben nicht verhindert werden konnte. Loeb, Fleischer und Hoyt fanden sogar, daß die Transudation in die Peritonealhöhle durch Einverleibung von Calciumchlorid sogar gesteigert werden kann. Im Gegensatz zu Lewy hatten R. Chiari und H. Januschke exsudathemmende Wirkungen des Calciums bei Vergiftung mit Diphtherietoxin, Natriumjodid und Thiosinamin beschrieben. Neuerdings erzielten H. van Cauvenberge und J. Lecomte mit Cortison keinen Effekt bei Anwendung einer von Ambrose und Eds angegebenen Methode. Dabei wird die Haut mit Chloroform abgerieben und die Zeit des Auftretens von intravenös injiziertem Chicagoblau auf der gereizten Hautstelle gemessen. ACTH und Natriumsalicylat dagegen hatten einen deutlichen Effekt. J. Böck, H. Kaunitz und H. Popper erzielten eine Verzögerung des Fluoresceinübertritts in das Kammerwasser des Kaninchens mit Ferrum oxydatum saccharatum, während in eigenen Versuchen an der allerdings pathologisch veränderten Capillardurchlässigkeit mit der gleichen Substanz ein nur geringer und mit Ferritrat kein Effekt erzielt werden konnte. Wahrscheinlich liegt dieser Unterschied an der von den genannten Autoren angewandten wesentlich höheren Dosis, deren Größe aus den gemachten Angaben allerdings nur ungefähr zu ersehen ist.

Ob man die bei hohen Dosen eintretende Hemmung des Eiklarödems allein auf das Ferrosulfat zurückführen kann, ist deswegen etwas zweifelhaft, weil auch mit reiner Ascorbinsäure bei mehrmaliger Applikation Ödemhemmung erzielt wurde. Das Ferrosulfat ist trotz des Zusatzes von reduzierender Ascorbinsäure noch so unbeständig, daß bei nur kurz dauerndem Luftzutritt schon eine leichte Violettfärbung als Zeichen der Gegenwart von Eisenhydroxyd, das durch Oxydation und Hydrolyse entsteht, auftritt. So ist wahrscheinlich ein Teil der ödemhemmenden Wirkung auf geringe Mengen Eisenhydroxyd zurückzuführen. Das Mohrsche Salz, bei dem das Eisen in seiner zweiwertigen Form wesentlich beständiger ist, erwies sich bei der Dosis von 1 mg Fe je Kilogramm genau wie das Ferrosulfat in gleicher und höherer Dosierung als völlig wirkungslos. Höhere Dosen des Ferroammonsulfats konnten wegen der zu großen Toxizität nicht angewandt werden. Mit gleichfalls 1 mg Fe je Kilogramm und gleicher Versuchszahl wurde dagegen mit Eisenammoniakalaun ein eindeutig ödemhemmender Effekt erzielt. Zwischen der Wirkung von zwei- und dreiwertigen Eisenalzen auf das Eiklarödem besteht also ein deutlicher Unterschied. Dieser Unterschied besteht auch hinsichtlich der Eiweißfällung und der Adstriktion, was beides für die Entzündungshemmung von Bedeutung sein könnte.

Seit R. Buchheim ist bekannt, daß Ferrosalze nicht eiweißfällend wirken, Ferrisalze dagegen in sehr kleinen und hohen Konzentrationen Eiweiße ausfällen. Eingehende Untersuchungen von W. Pauli und L. Flecker ergaben, daß Ferrisalz- und Ferrihydroxydfällungen identisch sind, d. h., es kann nach den Befunden der beiden Autoren als bewiesen angesehen werden, daß die durch Ferrisalze in geringen Konzentrationen bewirkten Eiweißfällungen tatsächlich durch das hydrolytisch entstehende Ferrihydroxyd hervorgerufen werden. Ferrihydroxyd hat die Fähigkeit, Micellen zu bilden, die eine geringe positive Ladung haben, Chloridionen abdissoziieren und sich gegenseitig in kolloidaler Lösung halten. Da Eiweißkomplexe Anionencharakter haben und Kolloide entgegengesetzter Ladung sich ausfällen, tritt beim Zusammenbringen mit Eisenhydroxyd Entladung und Fällung ein. Nach Befunden von E. Elöd und E. Seiler haben Ferrosalze auch keinen adstringierenden Effekt, wie er mit Ferrisalzen gut zu erzielen ist.

Ein negatives Resultat in bezug auf ödemhemmende Eigenschaften ergaben die Untersuchungen mit Ferritrat. Mit dem offizinellen Ferrum oxydatum saccharatum konnte bei einer Dosis von 10 mg Fe pro Kilogramm die Ödemintensität ebenfalls kaum beeinflußt werden. Dieses Eisenhydroxyd wird unter Verwendung von Saccharose als Peptisationsmittel in Gegenwart von Natronlauge in kolloidale Lösung gebracht und bildet negativ geladene Micellen, die die gleichartig geladenen Eiweißkörper nicht ausflocken.

Die hier erhobenen Befunde lassen die Annahme naheliegend erscheinen, daß die entzündungshemmende Eigenschaft mit der Eiweißflockung in einem kausalem Zusammenhang steht. Beide Eigenschaften kommen letztlich nur dem unter Säureeinwirkung entstandenen kolloidalen Eisenhydroxyd zu.

Zusammenfassung.

An der Senfölchemosis des Kaninchenauges und an der Eiklarhyperergie der Ratte wurden verschiedene Eisenverbindungen und ein Präparat aus der Pyrazolonreihe auf entzündungshemmende Eigenschaften getestet.

Mit einem nicht sehr stabilen Ferrosulfat-Ascorbinsäuregemisch wurde an der Senfölchemosis kein Effekt erzielt. Die Eiereiweißhyperergie der Ratte konnte durch Vorbehandlung mit der toxischen Dosis von 10 mg je Kilogramm gehemmt werden. Die Ödemhemmung ist vermutlich auf entstehendes Ferrihydroxyd und die in der Lösung enthaltene Ascorbinsäure zurückzuführen.

Das Mohrsche Salz hatte keinen Einfluß auf die Ödembildung, während Eisenammoniakalaun in gleicher Dosierung einen deutlich hemmenden Effekt hatte.

Ferritrat hatte selbst in Dosen von 20 mg Fe je Kilogramm keinen Einfluß auf die Ödembildung. Das offizinelle Ferrum oxydatum saccharatum beeinflußte bei einer Dosierung von 10 mg je Kilogramm die Ödemintensität kaum.

Fast vollständige Ödemhemmung wurde mit einer Dosis von 100 mg Irgapyrin pro Kilogramm erzielt.

Die entzündungshemmende Wirkung von Eisenverbindungen wird mit der eiweißfällenden Eigenschaft in einen ursächlichen Zusammenhang gebracht.

* Den Herstellerfirmen danke ich für die Überlassung von Versuchsmengen ihrer Präparate.

Literatur.

Böck, J., H. Kaunitz u. H. Popper; Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 170 (1935). — Buchheim, R.: zit. bei Starkenstein: Handb. d. exper. Pharmakol, III, 2, S. 733. — Cauvenberge, H. van, u. J. Lecomte: Experentia, **8**, 469 (1952). — Chiari, R., u. H. Januschke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **65**, 120 (1911). — Eichenberger, E., M. Schmidthauser u. G. Rufener: Helvet. acta Physiol. **10**, 505 (1952). — Elöd, E.: zit. bei E. Seiler: Med. Diss. 1951, Berlin. F. U. — Eppinger, H., J. Faltitschek, H. Kaunitz u. H. Dopper: Klin. Wschr. **1934**, 1137. — Gross, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 421 (1950). — Leger, J., G. Masson and J. L. Prado: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 366 (1947). — Levy, R.: Berl. klin. Wschr. **29**, 1322 (1911). — Loeb, Fleischer u. Hoyt: zit. ebenda. — Pauli, W., u. L. Flecker: Biochem. Z. **41**, 461 (1912). — Petersen, W. F., u. R. H. Jaffé: Wien. klin. Wschr. **1924**, 233. — Rosenow, G.: Z. exper. Med. **4**, 427 (1916). — Sabbatani, L.: zit. bei Starkenstein, Handb. der exper. Pharmakol. III, 2,1278. — Scheiffarth, F., u. G. Berg: Arzneimittelforschung **2**, 304 (1952). — Schneider, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 56 (1937). — Seiler, E.: Med. Diss. Berlin F. U. 1951. — Selye, H.: Endocrinologie **21**, 169 (1937). — Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Arzneimittelforschung **1**, 131 (1951).

Dr. Martin Kramer, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 398—413 (1953).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

Die Bedeutung der Schilddrüse für die Temperaturregulation.

Von

J. Pichotka, B. von Kügelgen und R. Damann.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Juli 1953.)

Über die Stellung der Schilddrüse im Rahmen der normalen Temperaturregulation besteht keineswegs Übereinstimmung. Eine erhebliche Zahl von Untersuchern hat sich dahin entschieden, daß die Schilddrüse von keiner oder unwesentlicher Bedeutung für die Temperaturregulation sei[5, 7, 8, 23]. Es ist weiterhin zu berücksichtigen, daß die älteren Autoren, die eine wesentliche Rolle der Schilddrüse in der Temperaturregulation für erwiesen erachteten, ihre Schlüsse entscheidend auf indirekte Beweise stützten. Insbesondere sind hierzu die histologischen Veränderungen der Schilddrüse mit Jahreszeit und Umgebungstemperatur herangezogen worden[2, 9, 11, 15, 16, 19, 22, 24]. In den letzten Jahren ist eine Reihe von Veröffentlichungen erschienen, die dem Problem näherrücken. Leblond und Gross[12], Ershoff[4], Sellers und You[21] fanden, daß nach Schilddrüsenausfall die Überlebenszeit unter extremen Umgebungstemperaturen stark verkürzt ist. Nach Untersuchungen von Schaeffer und Thibault[20] und von Gergely[6] wird nach Thyreoidektomie die Temperaturregulation schon bei Umgebungstemperaturen insuffizient, die normalerweise ohne Schwierigkeiten vertragen werden. In Übereinstimmung damit ist der Stoffwechsel von thyreoidektomierten Tieren in diesen extremen Situationen gegenüber dem von normalen Tieren erniedrigt[20]. Von Dempsey und Astwood[3] wurde schließlich nachgewiesen, daß der Thyroxinbedarf temperaturabhängig ist. Bei niederer Umgebungstemperatur wird mehr Thyroxin gebraucht als bei normaler oder hoher.

Eine direkte Messung des Einflusses der Schilddrüsenentfernung auf die wärmeregulatorische Leistung ist anscheinend nicht erfolgt.

Problemstellung und Methodik.

Die Bedeutung bestimmter Faktoren für Regulationsvorgänge innerhalb des Organismus ist nur zu erfassen, wenn es möglich ist, die Regeleigenschaften des betreffenden Systems quantitativ zu bestimmen. In der Temperaturregulation der Warmblüter müssen im Prinzip die

gleichen Schritte enthalten sein, wie in einem physikalischen Regelvorgang gleicher Art. Die konstant gehaltene Regelgröße (Körpertemperatur) muß durch einen temperaturempfindlichen Vorgang „gemessen" werden. Abweichungen von der Regelgröße müssen durch diesen Knotrollvorgang übertragen werden auf ein System, das die Abweichung durch eine entsprechende Wärmebildung kompensiert. Die Wärmeenergie, die zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur unter veränderlichen Umgebungsbedingungen notwendig ist, stammt also aus einem System, dessen Energieabgabe von der Körpertemperatur mittelbar oder unmittelbar gesteuert werden muß. Sinngemäß muß im Regulationsbereich mit dem Sinken der Körpertemperatur eine Zunahme der Wärmebildung verbunden sein und mit dem Anstieg der Körpertemperatur eine Abnahme. Nur diese Form der Beziehung zwischen Körpertemperatur und Wärmebildung ermöglicht eine Konstanz der Körpertemperatur (PICHOTKA[18]).

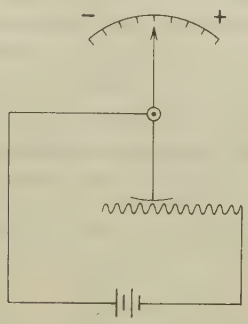


Abb. 1. Schema eines einfachen Regelkreises. Durch den Zeiger des Meßinstrumentes wird gleichzeitig der Schieber auf dem veränderlichen Widerstand verstellt. Bei Temperaturanstieg wird der Widerstand erhöht und damit der Stromfluß vermindert. Bei Erniedrigung der Temperatur findet sich das entgegengesetzte Verhalten.

In der Abb. 1 ist das einfachste Modell eines solchen temperaturregulierenden Systems dargestellt. Das die Temperatur anzeigende Instrument bewegt gleichzeitig den Schieber eines veränderlichen Widerstandes, so daß bei Abnahme der Temperatur der Widerstand im Stromkreis vermindert wird und damit der Stromfluß erhöht. Umgekehrt wird bei Erhöhung der Temperatur der Widerstand im Stromkreis erhöht und dadurch der Stromdurchgang vermindert. Ein komplizierteres Modell ist der übliche von einem Kontaktthermometer gesteuerte Thermostat. Die dem Wärmeentzug angemessene veränderliche Wärmezufuhr wird in einem solchen System dadurch erreicht, daß die an sich mit einer konstanten Leistung arbeitende Heizeinrichtung mit verschiedenen Intervallen und für verschieden lange Perioden eingeschaltet wird.

Regelsysteme haben eine beschränkte Leistungsfähigkeit. In dem in Abb. 1 dargestellten Modell ist die maximal mögliche Leistung gegeben, wenn der gesamte Widerstand ausgeschaltet ist — die Batterie also kurzgeschlossen ist. Wenn die dabei anfallende Energiemenge nicht genügt, um in einer bestimmten Situation die Regelgröße konstant zu halten — d. h. für die Temperaturregulation —, wenn die Wärmeabfuhr größer ist als die maximal mögliche Wärmebildung, so sinkt die Temperatur, obwohl alle Glieder des Regelkreises intakt und in voller

Funktion sind. Diese Überlegung zeigt, auf welchem Wege die Leistungsfähigkeit der Temperaturregulation gemessen werden kann. Zu diesem Zweck muß eine Wärmeabfuhr herbeigeführt werden, die die Wärmebildung übersteigt. Dadurch kommt es zu einer kontinuierlichen Minderung des Wärmeinhaltes des Systems, d. h. zu einem Abfall der Temperatur. Aus dem Verlauf des Temperaturabfalls bei bekanntem Wärmeentzug lassen sich die notwendigen Schlüsse ziehen. Der Abfall der Temperatur wird im ganzen um so steiler erfolgen, je mehr der Wärmeentzug die Bildung übersteigt. Bei konstantem Wärmeentzug wird sich eine *verschiedene Größe der Wärmebildung in verschiedenen Temperaturintervallen* des Regulationsbereiches in einer *veränderlichen Geschwindigkeit des Temperaturabfalles* ausdrücken. Eine Zunahme oder Verminderung der *gesamten regulatorischen Leistung* wird sich unabhängig vom Verlauf im einzelnen in einer Änderung der *Durchschnittsgeschwindigkeit* des Temperaturabfalles darstellen.

Die Untersuchungen wurden an Meerschweinchen durchgeführt. Im allgemeinen wurden die Tiere mehrere Wochen vor Versuchsbeginn unter kontrollierte Haltungsbedingungen genommen. Der Stall war das ganze Jahr hindurch temperiert (etwa 20°). Es wurde ausschließlich mit Heu, Rüben und Hafer gefüttert, um Beeinflussungen durch den üblichen jahreszeitlichen Fütterungswechsel auszuschließen. Die Gewichte der Tiere bewegten sich in zwei Gruppen, voll erwachsene Tiere mit mehr als 450 g und junge Tiere mit etwa 250—350 g Gewicht. Die Experimente erstreckten sich von Herbst 1951 bis Frühjahr 1953. Insgesamt wurden 156 Messungen an 107 Tieren durchgeführt.

Die Ausschaltung der Schilddrüse erfolgte sowohl operativ als medikamentös. Die Thyreoidektomie wurde in intraperitonealer Avertin-Narkose durchgeführt (0,5—0,8 cm^3 einer 2%igen Avertinlösung pro 100 g Gewicht). Die Schilddrüsen wurden vom Mittelschnitt her freipräpariert und nach Unterbindung an beiden Polen mit der Schere herausgetrennt. Der Schnitt wurde durch doppelte Catgut-Naht verschlossen. Die Tiere überstanden die Operation gut.

Zur medikamentösen Ausschaltung der Schilddrüse erhielten die Tiere Propylthiouracil (Thyreostat II von Dr. Herbrand Gengenbach, Baden) — und zwar 6 mg täglich oder jeden zweiten Tag. Das Medikament wurde in Form einer kleinen angefeuchteten Tablette mit der Pinzette direkt bis tief in den Schlund eingeführt. Die Tiere schlucken die Tabletten dann mit Sicherheit. Dieses Verfahren erwies sich als das zuverlässigste und schnellste.

Der Wärmeentzug wurde in dem größeren Teil unserer Versuche in einer kleinen Kühlkammer mit automatischer Temperaturkontrolle durchgeführt. Dazu wurde das Versuchstier in einem engen, zylinderförmigen Drahtkäfig zentral in der Kühlkammer aufgehängt. Um zu verhindern, daß während des Versuches durch Bewegung des Tieres die Meßeinrichtung aus ihrer Lage gebracht werden konnte, wurde der Raum in dem Käfig durch eingeschobene Drahtgitter so beschränkt, daß das Tier seine Position nicht mehr verändern konnte. Lageveränderungen des Kopfes und der Extremitäten waren möglich. Schon eine weiche Fesselung der Tiere auf dem üblichen Tierbrett führte zu weitgehender Minderung der Regulationsfähigkeit. Dabei tritt, wie bekannt, bereits bei normalen Labortemperaturen eine Senkung der Kerntemperatur ein. Aus diesem Grunde wurde jede Fesselung vermieden. Als günstigste Versuchsbedingungen erwiesen sich für uns Temperaturen der Kühlkammer um 0° C. Wir wählten schließlich die Temperaturen von + 1,5°, —1,5° und

—4,0° für die endgültigen Versuche. Es wurde jeweils der Abfall der Körpertemperatur von normalen, thyreoidektomierten und mit Thiouracil behandelten Tieren bei diesen Umgebungstemperaturen verglichen. Die Messung der Körpertemperatur erfolgte mit Thermoelementen aus Kupfer und Konstantan, die 6 cm tief in das Rectum eingeführt und befestigt wurden. Das Vergleichselement befand sich in schmelzendem Eis. Die Leitungen waren in jeder Weise gegen störende Nebenpotentiale gesichert. Abgelesen wurde auf Ruhstrat-Galvanometern mit 16 Ω Innenwiderstand. Die Genauigkeit der rectalen Temperaturmessung war etwa $\pm$ 0,1°. Im Kühlraum schwankte die Temperatur etwa mit $\pm$ 0,5° um den angegebenen Wert.

In 19 Experimenten wurde während der Abkühlung außer der Rectaltemperatur laufend die *Stoffwechselgröße* gemessen. Neben der Korrelation dieser beiden Größen interessierten uns vor allem die absoluten Werte für den maximalen Energieumsatz normaler und thyreoidektomierter Tiere. Diese Werte sind aus dem Verlauf der Kerntemperatur allein nicht zu erfassen. Die Tiere wurden in diesen Versuchen in eine genau passende kleine Kupferkammer mit Glasdach gesetzt und die ganze Kammer in Wasser von 0° C getaucht. Durch die Kammer wurde mit Hilfe einer kleinen Druckpumpe ein konstanter Luftstrom geschickt, dessen Änderung in der Sauerstoff- und Kohlensäurekonzentration laufend gemessen wurde. Die Abkühlungsgeschwindigkeit in dieser Versuchsanordnung erwies sich im Rahmen der möglichen Genauigkeit als identisch mit der bei einer Temperatur von —1,5° C in unserer automatischen Kühlkammer. Die genauen experimentellen Daten finden sich im Rahmen einer anderen Untersuchung[18].

Ergebnisse.

Messungen an Normaltieren.

Es wurden 78 Messungen an 59 normalen Tieren durchgeführt. Der Abfall der Körpertemperatur wies unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ein charakteristisches Verhalten auf. Er erfolgte nicht gleichmäßig, sondern die Geschwindigkeit des Abfalles war in verschiedenen Temperaturintervallen deutlich verschieden. In vielen Fällen kam der Temperaturabfall auf einem erniedrigten Niveau für längere Zeit zum Stehen. In extremen Fällen fand sich so eine über Stunden konstant gehaltene erniedrigte Rektaltemperatur, bevor ein weiterer Abfall einsetzte. Ein geringer Zwischenanstieg der erniedrigten Temperatur im Verlauf der Abkühlung kam ebenfalls in einigen Fällen zur Beobachtung. Dieses Verhalten ist schon aus einer Reihe früherer Untersuchungen bekannt[1, 9, 13, 14].

Die Verlangsamung oder der Stillstand des Temperaturabfalles ist offensichtlich an mehrere bestimmte enge Temperaturintervalle gebunden, deren Bedeutung bei den einzelnen Tieren verschieden ist. Bei einem Teil der Tiere wurde eine solche Beeinflussung des Temperaturabfalles nur in der Bildung eines einzigen Niveaus beobachtet, bei anderen fand sich ein Abfall in drei deutlichen Stufen. Immer waren es aber die gleichen Temperaturintervalle, in denen eine solche Verlangsamung des Temperaturabfalles auftrat. Die Analyse dieser Verhältnisse ist Objekt einer anderen Untersuchung[18]. Der stufenförmige Abfall der Temperatur trat besonders bei geringen Kühlgrößen in Erscheinung.

Aber auch bei den in dieser Untersuchung gewählten relativ großen Kühlgeschwindigkeiten ist er oft deutlich vorhanden.

In der Abb. 2 ist der Verlauf der Rektaltemperaturen in einer Gruppe von Normaltieren dargestellt. Das Bild ist charakteristisch für das Verhalten bei einer Umgebungstemperatur von —1,5°. Im Verhältnis zu den Ergebnissen nach Thyreoidektomie ist die Streuung dieser Verläufe sehr groß. Es ließ sich eine Korrelation dieser Streuung zu verschiedenen Größen nachweisen. Die engste Beziehung ergab sich zum Körpergewicht. So erfolgte vergleichsweise bei einer Umgebungstemperatur von

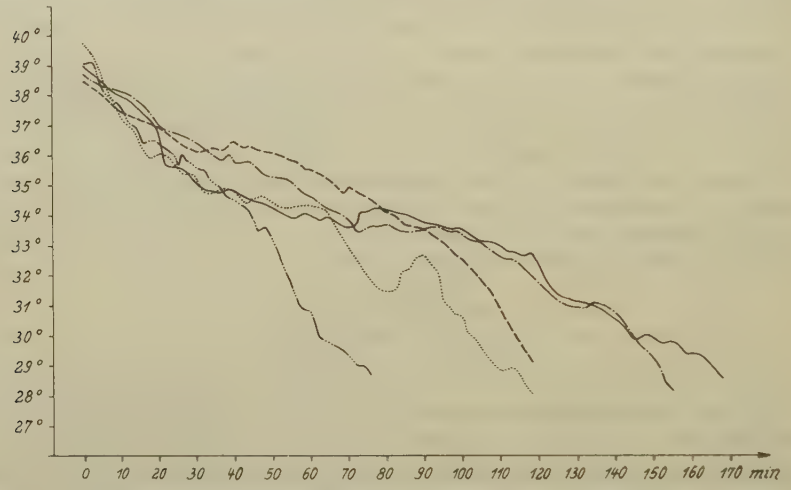


Abb. 2. Abfall der Rektaltemperatur von normalen Meerschweinchen während der Abkühlung in einer Kühlkammer bei —1,5° C. Charakteristisch ist die starke Streuung und der flachere Verlauf der Kurven von 37° bis 33°. Oberhalb und unterhalb dieses Intervalls laufen die Kurven im wesentlichen parallel. Die starke Streuung ist bedingt durch die verschiedene Länge des flacheren Kurvenabschnitts zwischen 37° und 33°.

—1,5° der Abfall auf die Rektaltemperatur von 30° bei 13 Tieren von 200—300 g Gewicht in 74 ± 10 min, bei 10 Tieren von 300—400 g Gewicht in 96 ± 20 min, bei 11 Tieren über 400 g Gewicht (Durchschnitt 645 g) in 220 ± 20 min. Hinter der leicht faßlichen Gewichtsgröße verbirgt sich hier wahrscheinlich eine ganze Reihe von Faktoren, so z. B. Alter, Konstitution, eventuell Schwangerschaft usw. Das wird vor allem nahegelegt durch die Differenz zwischen den praktisch erwachsenen Tieren von 300—400 g Gewicht gegenüber den Tieren von mehr als 400 g Gewicht. Eine Abhängigkeit von der Jahreszeit schien aus einigen Beobachtungen hervorzugehen, konnte aber nicht schlüssig nachgewiesen werden. Vergleiche über die Bedeutung des Schilddrüsenausfalles sind nur durchgeführt worden zwischen Gruppen des *gleichen Gewichtes*, die in die *gleiche Versuchszeit* fallen. Insbesondere wurden für den Vergleich Gewichtsgruppen über 400 g nicht herangezogen.

Messungen nach Ausfall der Schilddrüsenfunktion.

Die Messungen an thyreoidektomierten Tieren wurden im Abstand von 2—4 Wochen nach der Operation durchgeführt. Die Operationsfolgen waren zu dieser Zeit sicher abgeklungen. Außer einer mäßigen Senkung der Rektaltemperatur, die später besprochen wird, waren keine klinischen Veränderungen zu beobachten.

Der Verlauf der Rektaltemperatur bei dem gleichen Wärmeentzug zeigt bei thyreoidektomierten Tieren ein völlig anderes Verhalten als es für die normalen Tiere beschrieben wurde (Abb. 3). Die Temperatur fällt steil und gleichmäßig vom Ausgangswert ab. Es zeigen sich nur geringe Schwankungen, die den Gesamtverlauf nicht beeinflussen. Es ist wesentlich, zu bemerken, daß die Verläufe im untersuchten Temperaturbereich alle praktisch parallel liegen. Niveaubildungen oder wesentliche Verlangsamungen des Temperaturabfalles in bestimmten Intervallen treten nicht hervor. Die für die normalen Tiere charakteristische Streuung fehlt völlig. Im allgemeinen waren bereits bei dem Vergleich von Gruppen von 5 Tieren die Zeiten bis zum Abfall auf 30° bei normalen und thyreoidektomierten Tieren signifikant verschieden.

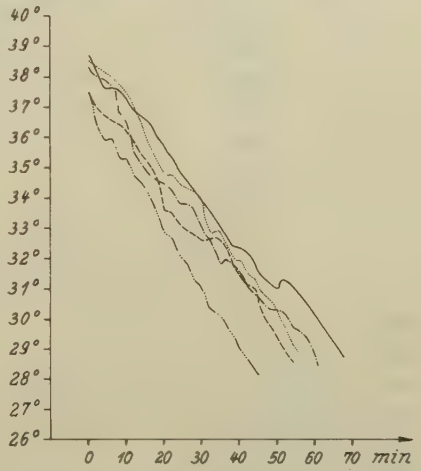


Abb. 3. Abfall der Rektaltemperatur von thyroidektomierten Meerschweinchen unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 2. Praktisch paralleler Abfall aller Kurven. Der flache Abfall der Rektaltemperatur zwischen 37° und 33°, der Ausdruck der regulatorischen Leistung ist, fehlt vollständig.

Nach diesem Ergebnis schien es naheliegend, den Einfluß der Thiouracilmedikation auf das Verhalten der Rektaltemperatur bei Abkühlung zu untersuchen. Es wurden 17 Tiere mit täglichen oder zweitäglichen Dosen von 6 mg Propylthiouracil gefüttert und in verschiedenem Abstand nach Beginn der Medikation der Abkühlung unterworfen. Nach einer Thiouracil-Behandlung von etwa 4 Wochen Dauer findet sich bei allen Tieren ein Verlauf, der mit dem Verhalten nach Thyreoidektomie identisch ist. Die Rektaltemperaturen fallen kontinuierlich ab, ohne wesentliche Besonderheiten in bestimmten Temperaturbereichen erkennen zu lassen. Die Uniformität der Verläufe ist eher noch größer als nach Thyreoidektomie (Abb. 4c).

Kürzere Medikationszeiten oder geringere tägliche Dosen an Thiouracil führten zu kontinuierlichen Übergangsbildern im Abkühlungsversuch

zwischen dem Verhalten von normalen und thyreoidektomierten Tieren. Dieser Übergang ließ sich in 2 Versuchsserien, an denen laufend während der Thiouracilmedikation Messungen durchgeführt wurden, gut verfolgen. In den Abb. 4a, b und c sind solche Übergänge rein bildmäßig zusammengestellt.

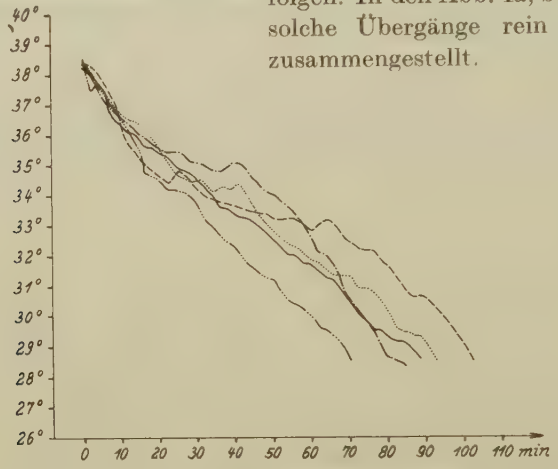


Abb. 4a. Nach durchschnittlich 15 Tagen.

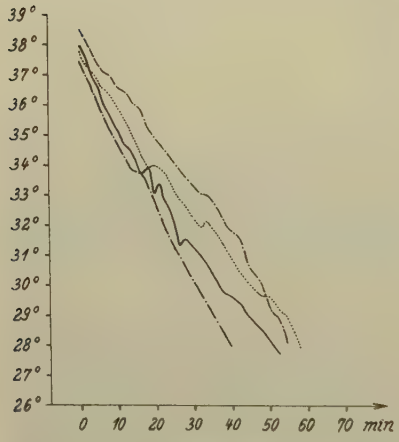


Abb. 4b. Nach durchschnittlich 20 Tagen.

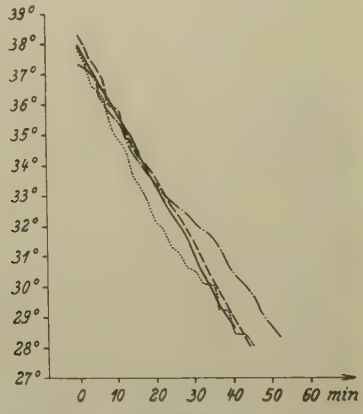


Abb. 4c. Nach durchschnittlich 28 Tagen.

Mit der Dauer der Behandlung zunehmend eine Abnahme und ein Verschwinden der flachen Kurvenabschnitte im Bereich unterhalb der Normaltemperatur (vgl. Abb. 2). In der Abb. 4c sieht man, daß die Rektaltemperaturen ohne jede erkennbare Regulationsbewegung abfallen.

Abb. 4. Abfall der Rektaltemperatur von Meerschweinchen während der Abkühlung unter definierten Bedingungen nach verschieden langer Medikation mit Propylthiouracil.

In der Abb. 5 sind die mittleren Temperaturverläufe während des Abkühlungsversuches bei normalen thyreoidektomierten und mit Thiouracil behandelten Tieren dargestellt. Die hier verglichenen Experimente

sind an Tieren gleichen Gewichts und in der gleichen Versuchsperiode bei —1,5° in der Kühlkammer durchgeführt. Die mittleren Versuchszeiten bis zum Erreichen von 30° Körpertemperatur betragen für

10 Normaltiere	122 ± 20 min
12 Tiere mit Thiouracil behandelt	39 ± 2 min
5 thyreoidektomierte Tiere	49 ± 4 min.

Für die 17 Tiere mit Ausfall der Schilddrüsenfunktion gemeinsam ergibt sich ein Mittelwert von 42 ± 2 min. Alle Gruppen sind damit nach den

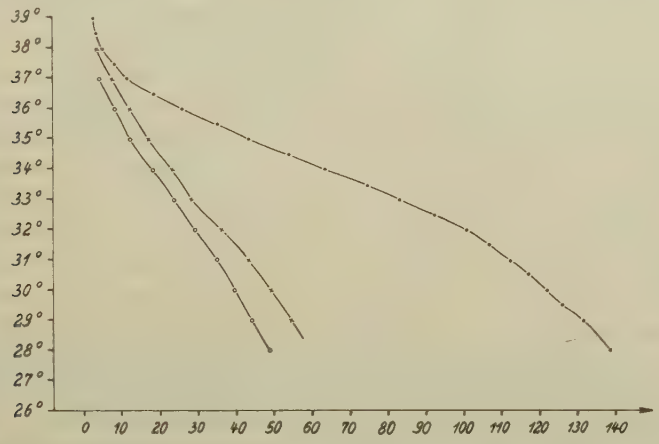


Abb. 5. Mittelwertskurven des Abfalls der Rektaltemperatur von Normaltieren ○——○, schilddrüsenlosen Tieren ×——×, und mit Propylthiouracil behandelten Tieren •——•.

üblichen Kriterien von den Normalwerten signifikant verschieden (für alle Werte $P < 0{,}001$). Die Differenzen sind bei allen vergleichbaren Gruppen dieser Untersuchung von der gleichen Größenordnung.

Gleichzeitige Messung von Temperaturverlauf und Sauerstoffaufnahme während der Akbühlung.

Die gleichzeitige Messung des Temperaturverlaufes und der Sauerstoffaufnahme während des Abkühlungsversuches stellt die Bedeutung der Stoffwechselgröße für die Geschwindigkeit des Temperaturabfalles klar. In den Abb. 6, 7 und 8 sind charakteristische Beispiele für das Verhalten von normalen Tieren und von Tieren mit ausgefallener Schilddrüsenfunktion dargestellt. Bei normalen Tieren schnellt die Sauerstoffaufnahme mit dem Abfall der Rektaltemperatur im allgemeinen auf Werte, die annähernd beim 2,5—3fachen des Ausgangswertes liegen (Abb. 6). Bei thyreoidektomierten oder mit Thiouracil behandelten Tieren findet sich unter diesen Bedingungen auch ein Anstieg der Sauerstoffaufnahme, aber von einem viel geringeren Ausmaß. Auch bei noch

nicht sicher vermindertem Grundumsatz tritt diese Minderung der regulatorischen Erhöhung der Stoffwechselleistung deutlich in Erscheinung (Abb. 7).

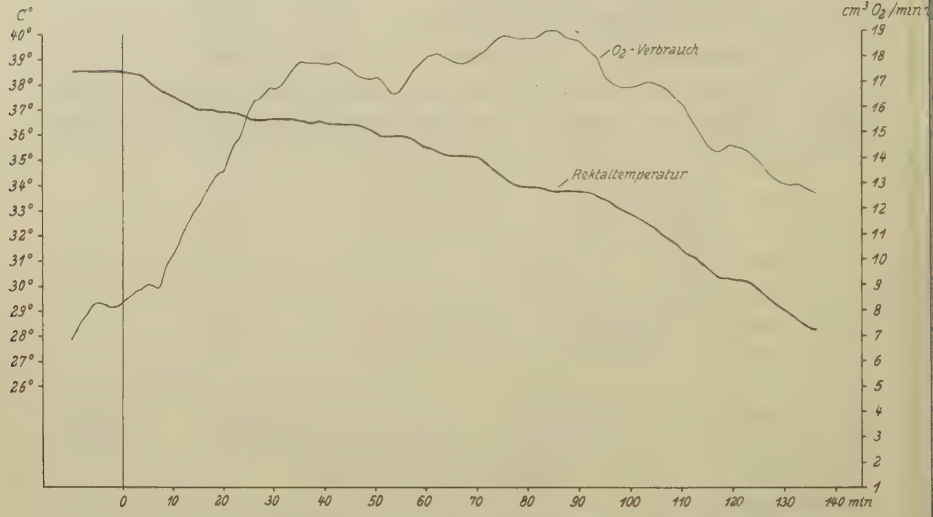


Abb. 6. Verlauf von Rektaltemperatur und O_2-Aufnahme während der Abkühlung bei einem normalen Meerschweinchen. Der Grundumsatz des Tieres betrug etwa 6 cm³ O_2/min. Im Maximum stieg der Umsatz auf mehr als das 3fache dieses Wertes. Der hier dargestellte Ablauf ist charakteristisch.

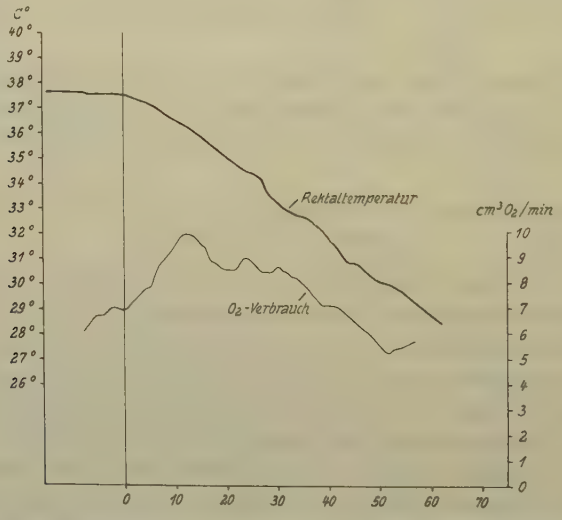


Abb. 7. Verhalten der Rektaltemperatur und O_2-Aufnahme während der Abkühlung eines mit Thiouracil behandelten Tieres. Der Versuch wurde etwa 3 Wochen nach Beginn der Medikation durchgeführt. Obwohl der Grundumsatz (etwa 6 cm³ O_2/min) nicht gesenkt war, fand sich nur ein geringer Anstieg der O_2-Aufnahme während der Abkühlung auf etwa 9 cm³ O_2/min im Maximum.

Die richtige Darstellung der hier vorliegenden Verhältnisse ist am besten durch die Absolutzahlen für die maximale Stoffwechselgröße unter den verschiedenen Bedingungen möglich. Die in Abb. 6, 7 und 8 dargestellten Experimente sind an Tieren gleichen Gewichts (etwa. 400 g) durchgeführt worden. Bei dem Normaltier (Abb. 6) haben wir einen Ausgangsstoffwechsel von etwa 6 cm³ O_2 pro Minute. Im Maximum der Stoffwechselsteigerung nimmt das Tier 20 cm³ O_2 pro Minute auf. In der Abb. 7 ist das Verhalten eines mit Thiouracil behandelten Tieres dargestellt, dessen Grundumsatz sich während der Vorbehandlung nicht meßbar gesenkt hat. Obwohl dieses Tier praktisch den gleichen Ausgangsstoffwechsel hat wie das in Abb. 6 dargestellte Normaltier, steigt die Sauerstoffaufnahme im Maximum nicht einmal mehr ganz auf 10 cm³ O_2 pro Minute. Bei dem thyreoidektomierten Tier (Abb. 8) ist eine deutliche Herabsetzung des Ruheumsatzes eingetreten. Die Sauerstoffaufnahme beträgt im Ausgang 4 cm³ pro Minute und erreicht im Maximum etwa 6 cm³ pro Minute.

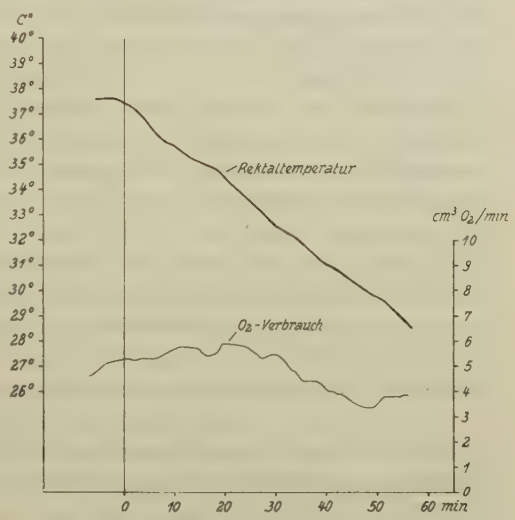


Abb. 8. Verhalten der Rektaltemperatur und O_2-Aufnahme während der Abkühlung eines thyreoidektomierten Tieres. Der Grundumsatz des Tieres war von etwa 6 cm³ O_2/min auf 4 cm O_2/min abgefallen. Während der Abkühlung wird maximal nicht mehr eine O_2-Aufnahme erreicht, die dem Ausgangsgrundumsatz entspricht.

Es ist nicht versucht worden, die Werte für die Differenz in der Sauerstoffaufnahme zwischen normalen Tieren und Tieren mit verminderter oder aufgehobener Schilddrüsenfunktion statistisch zu sichern. Die kausale Verknüpfung zwischen Sauerstoffaufnahme, Wärmebildung und Temperaturänderung macht diesen Schritt überflüssig. Die statistisch gesicherte Differenz in der Geschwindigkeit des Temperaturabfalles zwischen den beiden untersuchten Gruppen gilt sinngemäß auch für die Sauerstoffaufnahme. Die in den Beispielen angegebenen Zahlen für die Sauerstoffaufnahme sind in der richtigen Größenordnung.

Auswertung der Ergebnisse und Diskussion.

Wenn bei der Abkühlung eines tierischen Organismus die Wärmebildung von konstanter Größe bliebe, so würde der Temperaturverlauf sich in einer e-Funktion auf den Wert des kühleren Außenmediums hin-

bewegen. Die Wärmebildung würde nur als Vergrößerung der Kapazität des abgekühlten Körpers in Erscheinung treten. Wenn, wie nach dem Lehrbuchwissen im allgemeinen vorausgesetzt wird, die Wärmebildung sich mit der Körpertemperatur im Sinne des van t' Hoffschen Gesetzes veränderte, dann müßte eine Versteilerung des Erfolges jeder Wärmebewegung gegenüber einem Körper ohne Wärmebildung oder einem Körper mit konstanter Wärmebildung eintreten. Eine Erhöhung des Wärmeentzugs müßte nicht nur zu einer Temperatursenkung, sondern in deren Gefolge auch zu einer Stoffwechselsenkung führen; dadurch hinwiederum würde bei dem bestehenden Wärmeentzug die Temperatur noch weiter gesenkt mit einer weiteren Senkung des Stoffwechsels usw. Ein solches System wäre nicht nur nicht stabil, sondern absolut labil; jede äußere Temperaturveränderung in der einen oder anderen Richtung müßte zum Überschlagen der Körpertemperatur in Extremwerte führen.

Da die Körpertemperatur der warmblütigen Tiere aber eine geregelte Größe ist, muß notwendigerweise in einem bestimmten Temperaturintervall unterhalb der Normaltemperatur eine Zunahme der Wärmebildung mit fallender Temperatur erfolgen. Diese Folgerung ergibt sich zwingend aus der Tatsache der Konstanz der Körpertemperatur. Nur durch eine Steigerung des Stoffwechsels mit fallender Körpertemperatur kommt es zur Verlangsamung des Abfalles oder zum Stillstand der Körpertemperatur auf einem erniedrigten Niveau[18].

Der Verlauf der Körpertemperatur bei Abkühlung ist daher die Resultante aus dem durch die Umgebungsbedingungen verursachten Wärmeverlust und der durch die Temperatursenkung herbeigeführten Erhöhung der Wärmebildung. Nur unter dem Einfluß der Abkühlung müßte der Verlauf der Körpertemperatur den bekannten einfachen Gesetzen folgen. Jede Abweichung hiervon muß Folge der veränderlichen Wärmebildung sein. Wir können a priori keine Aussage darüber machen, in welchem Temperaturbereich und in welcher Form die regulatorische Stoffwechselsteigerung mit fallender Temperatur erfolgt. Das kann erst die Analyse der Abweichungen des tatsächlichen Temperaturverlaufs von dem bei einfacher Abkühlung zu erwartenden ergeben.

Die Auswertung der Messungen erfolgt unter zwei wesentlichen Voraussetzungen:

1. Die Rektaltemperatur ist unter den hier verwandten Versuchsbedingungen ein vernünftiges Maß für die Durchschnittstemperatur des Körpers; damit wird durch die Rektaltemperatur auch die Temperaturverteilung im Körper repräsentiert.

2. Der Wärmeentzug bei der gleichen Rektaltemperatur und bei gleichen äußeren Bedingungen ist in verschiedenen Experimenten mit verschiedenem zeitlichen Verlauf gleich.

Diese Prämissen sind unter den experimentellen Bedingungen und für das Ziel dieser Untersuchung sicher berechtigt. Damit wird aber die Zeitdauer, die bei konstantem Wärmeentzug für das Durchlaufen eines bestimmten Temperaturintervalles erforderlich ist, ein Maß für die in diesem Intervall gebildete Wärme.

Das Bestehenbleiben einer normalen oder annähernd normalen Körpertemperatur nach Thyreoidektomie, kann nicht dahin gedeutet werden, daß die Schilddrüse ohne Bedeutung für die Wärmeregulation sei. Daß eine Beeinflussung der Wärmeregulation durch den Schilddrüsenausfall eintritt, geht eindeutig aus den Temperaturverläufen bei Abkühlung hervor. Bei schilddrüsenlosen Tieren erfolgt bei gleicher Abkühlungsgröße der gesamte Temperaturabfall viel steiler als bei Normaltieren (Abb. 3). Ein solch steilerer Temperaturabfall könnte sowohl durch eine Erhöhung der Wärmeabgabe als durch eine Verminderung der Wärmebildung bedingt sein. Unter den hier verwandten Versuchsbedingungen — bei denen es praktisch mit Versuchsbeginn zu einer Senkung der Korntemperatur kommt — ist die Körperschale von Beginn an unter Temperaturbedingungen, die kaum regulative Bewegungen im Sinne der physikalischen Wärmeregulation erlauben. Es muß sich also um Änderungen der Wärmebildung handeln, wie später an Hand der Stoffwechselmessungen noch einmal erörtert wird.

Wie sind die Unterschiede im Verlaufe der Rektaltemperaturen sinnvoll quantitativ zu erfassen? Die Messung der Rektaltemperatur erfolgte in unserer Untersuchung zwischen dem Ausgangswert und 30°. Aus früheren Untersuchungen haben wir den Schluß gezogen, daß die wesentlichen Regulationserscheinungen innerhalb dieses Temperaturintervalls erfolgen[17]. Ein Vergleichsmaß für die regulatorische Leistung wäre der Temperaturabfall in diesem Intervall innerhalb einer definierten Zeit und bei konstantem Wärmeentzug. Noch brauchbarer ist die Messung der Zeit, in der ein bestimmtes Temperaturintervall durchlaufen wird. Für das gleiche Temperaturintervall sind diese Zeiten bei angenommenen gleichen Bedingungen der Wärmeabgabe unmittelbar ein Maß für die innerhalb dieses Intervalls abgegebenen relativen Energiemengen.

In der Abb. 5 sind die Mittelwertskurven der Temperaturverläufe bei normalen und schilddrüsenlosen Tieren dargestellt. Der durchschnittliche Temperaturverlauf bei den normalen Tieren zeigt nach einem steilen Anfangsteil einen flacheren Abschnitt im Bereich zwischen 37° und 33°. Unterhalb 33° verläuft der Temperaturabfall zunehmend steiler und erreicht die gleiche Geschwindigkeit, wie sie bei thyreoidektomierten Tieren im ganzen Verlauf besteht. Diese Verlaufsform ist offensichtlich bedingt durch eine regulatorische Stoffwechselsteigerung im Intervall zwischen 37 und 33°. In der Mittelwertskurve des Temperaturverlaufs der schilddrüsenlosen und der mit Thiouracil behandelten Tiere ist ein wesent-

licher regulatorischer Einfluß nicht erkennbar. Die in den Einzelkurven noch vorhandenen schwachen Regulationsbewegungen sind hier durch Interferenz der einzelnen Verläufe verwischt.

Eine quantitative Aussage über die wärmeregulatorische Leistung der hier verglichenen Gruppen läßt sich insofern machen, als das Verhältnis der in einem bestimmten Temperaturintervall abgegebenen Wärmemengen gleich dem Verhältnis der Zeiten ist, in denen dieses Intervall durchlaufen wird. Dieses Verhältnis ist in den verschiedenen Abschnitten nicht konstant, wie sich aus der Betrachtung der Kurven ergibt. Bildet man fortschreitend den Quotienten der Zeiten, in welchen in beiden Gruppen die verschiedenen Temperaturen erreicht werden, so wächst dieser Quotient zunächst kontinuierlich bis zu einem Maximum, um dann langsam wieder abzunehmen. Das Maximum des Quotienten liegt bei 33°, am Ende des flachen Kurvenabschnittes, der durch die regulatorische Steigerung der Wärmebildung bei normalen Tieren bedingt ist. Hier beträgt er im Durchschnitt mehr als 3, d. h. die bis zu dieser Temperatur von den normalen Tieren abgegebene Gesamtwärme ist mehr als 3mal so groß als die im gleichen Intervall von thyreoidektomierten Tieren abgegebene Wärme. Die Differenzen sind statistisch signifikant ($P < 0{,}001$).

Die abgegebene Wärmemenge setzt sich zusammen aus der *Abnahme des Wärmeinhaltes* durch die Temperatursenkung und der beim Durchlaufen dieses Temperaturintervalls *gebildeten Wärme*. Da die erste unabhängig vom Funktionszustand der Schilddrüse bei gleicher Ausgangstemperatur in den verglichenen Gruppen im wesentlichen gleich ist, müssen die Differenzen im Temperaturverlauf sich auf die gebildete Wärme beziehen. Der Anteil der gespeicherten Wärme an der Gesamtwärmeabgabe unter den Bedingungen unserer Experimente ist andererseits nicht unbeträchtlich. Dieser Anteil ist in gleicher Größe in dem Kurvenverlauf für normale und thyreoidektomierte Tiere enthalten. Wenn der Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen nur auf die während der Versuchszeit gebildete Wärme begrenzt ist, werden die Verhältnisse naturgemäß noch mehr zu ungunsten der thyreoidektomierten Tiere verschoben.

Diese Schlüsse, die sich zunächst nur aus dem Temperaturverlauf bei Abkühlung ergeben, werden durch die gleichzeitigen Stoffwechselmessungen vollkommen gestützt. Bei thyreoidektomierten Tieren findet sich nur eine geringe Steigerung des Umsatzes während der Abkühlung (Abb. 8). Im allgemeinen wird keine Verdoppelung des erniedrigten Grundumsatzes erreicht. Bei normalen Tieren findet sich dagegen in den meisten Fällen maximal etwa eine Verdreifachung des normalen Ausgangsumsatzes (Abb. 6). Für den Vergleich maßgeblich ist die absolute Größe des maximalen Umsatzes. Auf das gleiche Tiergewicht

berechnet liegt der Maximalumsatz normaler Tiere etwa 3mal so hoch wie der thyreoidektomierter Tiere.

Die im Verlauf dieser Untersuchung zum Vorschein gekommene Übereinstimmung in den numerischen Ergebnissen der beiden hier angewandten unabhängigen Meßmethoden ist zufällig, denn die gemessenen Größen sind nicht direkt vergleichbar. Da die beiden Meßmethoden sich letztlich aber auf das gleiche Ereignis beziehen — nämlich auf die Wärmebildung — müssen sie korrelierbar sein. Dazu ist eine Reihe von Punkten zu berücksichtigen. Zum Vergleich muß natürlich auf der einen Seite die *absolute* Stoffwechselgröße eingeführt werden. Die hiermit in Beziehung zu bringende Zeit für das Durchlaufen eines bestimmten Temperaturintervalles bei konstantem Wärmeentzug ist komplizierter zusammengesetzt. Zunächst ist in dieser Zeit ein Anteil enthalten, der sich aus der Änderung des Wärmeinhaltes ergibt, wie bereits ausführlich besprochen wurde. Dieser Anteil wird in der Stoffwechselgröße nicht reflektiert. Er läßt sich eliminieren sozusagen durch Extrapolation der Messung auf die Stoffwechselgröße 0. Nach Entfernung dieses Anteils sind Stoffwechselgrößen und Zeit zum Durchlaufen eines bestimmten Temperaturintervalls durch eine tangens-Funktion verbunden. Das ergibt sich aus der Überlegung, daß wenn die Stoffwechselgröße gleich dem Wärmeentzug ist, die Zeit zum Durchlaufen eines bestimmten Temperaturintervalles unendlich wird. Diese Tatsache trägt sehr zur Klärung der großen Streuung in den Temperaturverläufen bei Normaltieren bei (Abb. 2). Für den in dieser Untersuchung durchgeführten statistischen Vergleich zweier Wertegruppen ist die Tatsache, daß diese Wertegruppen einer tangens-Funktion angehören, ohne Bedeutung für die Signifikanz der Differenz dieser Werte. Die einzige Voraussetzung dafür ist die *Stetigkeit* der unterliegenden Funktion. Dagegen muß für den Vergleich verschiedener Mittelwerte berücksichtigt werden, daß es sich nicht um lineare Größen, sondern um eine tangens-Funktion handelt.

Aus dem Dargestellten ergibt sich, daß der Verlust der Schilddrüsenfunktion die Wärmeregulation aufs schwerste beeinträchtigt. Der regulierte Zustand als solcher — d. h. die gegensätzliche Bewegung von Körpertemperatur und Stoffwechselgröße — ist zwar erhalten. Ohne dieses Verhalten wäre das Überleben eines warmblütigen Tieres ja schlechterdings unmöglich. Aber die Energiemenge, die der Organismus einsetzen kann, um der Verschiebung der Körpertemperatur aus dem Regulationsbereich zu begegnen, ist bei thyreoidektomierten Tieren nur ein Bruchteil dessen, was der normale Organismus einsetzt.

Dabei ist noch einmal zu betonen, daß offenbar die Charakteristik des Regulationsverhaltens bei normalen und thyreoidektomierten Tieren gleich ist. Die schwachen Regulationserscheinungen der thyreoidektomierten Tiere erfolgen in den gleichen Intervallen der Rektaltemperatur

wie bei normalen Tieren. Diese Verhältnisse werden besonders klar, wenn man die Ergebnisse bei den mit geringeren Dosen Thiouracil behandelten Tieren hinzunimmt (Abb. 4). Dort zeigt sich, wie die überwiegend horizontalen Abschnitte der Temperaturverläufe bei Abkühlung, die ja Ausdruck der regulatorischen Leistung sind, zwar immer noch bei den gleichen Temperaturen auftreten, aber zunehmend kürzer werden. Alle diese Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß die Zunahme der Stoffwechselgröße über der fallenden Rektaltemperatur bei normalen und thyreoidektomierten Tieren nach der gleichen Funktion erfolgt. Die Gesamtgröße dieser Zunahme ist dabei bei thyreoidektomierten nur ein Bruchteil der Zunahme bei normalen Tieren.

In diesem Zusammenhang ist aber auch die Bedeutung der Verschiebung der durchschnittlichen Rektaltemperatur bei Fehlen der Schilddrüse zu diskutieren. Bekanntlich sinkt bei den meisten Tieren die durchschnittliche Rektaltemperatur nach Entfernung der Schilddrüse um etwa 0,5—1,0°. Diese Erscheinung ist so zu interpretieren, daß schilddrüsenlose Tiere bereits unter normalen Umständen den mit dieser Temperatursenkung verbundenen wesentlichen Teil ihrer gesamten Regulationskapazität gebrauchen, um ins Wärmegleichgewicht zu kommen. Das ist natürlich einer der Gründe, weshalb die zusätzliche regulatorische Leistung bei Abkühlung so sehr gering ist.

Zusammenfassung.

In Untersuchungen an Meerschweinchen wird nachgewiesen, daß nach Ausfall der Schilddrüse die Temperaturregulation aufs schwerste geschädigt ist. Die Energiemenge, die der Organismus einsetzen kann, um eine Temperaturverschiebung zu verhindern, beträgt bei schilddrüsenlosen Tieren nur einen Bruchteil des normalen Betrages. Diese Folgerungen ergeben sich aus der Tatsache, daß bei gleicher Größe des Wärmeentzuges die Temperatur von schilddrüsenlosen Tieren viel schneller fällt als von normalen und daß korrespondierend die Sauerstoffaufnahme während der Abkühlung bei schilddrüsenlosen Tieren viel geringer ist als bei normalen Tieren.

Literatur.

[1] Boehm, R., u. F. A. Hoffmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **8**, 375 (1878). — [2] Cramer, W.: Fever, Heatregulation Climate and the Thyreoid-Adrenal Apparatus. London 1928. — [3] Dempsey, E. W., and E. B. Astwood: Endocrinology **32**, 509 (1943). — [4] Ershoff, B. H.: Endocrinology **43**, 36 (1948). — [5] Grafe, E., u. E. v. Redwitz: Hoppe-Seylers Z. **119**, 125 (1922). — [6] Gergely, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 597 (1943). — [7] Hildebrand, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **90**, 330 (1921). — [8] Isenschmid, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **98**, 221 (1923). — [9] Kenyon, A. D.: Amer. J. Path. **9**, 347 (1933). — [10] Kramer, K., u. H. Reichel: Klin. Wschr. **1944**, 192. — [11] Kuschinsky, G.:

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 726 (1935). — [12] Leblond, C. P., and J. Gross: Endocrinology **33**, 155 (1943). — [13] Lefevre, J.: Chaleur animale et bioénergetique. Paris 1911. — [14] Meidinger, O.: Z. Biol. **100**, 361 (1940). — [15] Mills, C. A.: Amer. J. Physiol. **46**, 329 (1918). — [16] Nishimura, S., K. Nitta u. T. Minouchi: Fol. endocrin. jap. **4**, 74 (1928). — [17] Pichotka, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 317 (1952). — [18] Pichotka, J.: in Vorbereitung. — [19] Ring, G. C.: Amer. J. Physiol. **116**, 129 (1936). — [20] Schaeffer, G., et O. Thibault: C. r. Soc. Biol. Paris **139**, 1036 (1945). — [21] Sellers, E. A., and S. S. You: Amer. J. Physiol. **163**, 81 (1950). — [22] Starr, P., and R. Rosskelley: Amer. J. Physiol. **130**, 549 (1940). — [23] Thauer, R.: Erg. Physiol. **41**, 607 (1939). — [24] Woitkewitsch, A. A.: Virchows Arch. **294**, 653 (1935).

Dr. Jos. Pichotka, Freiburg i. Br., Katharinenstr. 29, Physiologisches Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 414—417 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser).

Über die Fortpflanzungsfähigkeit der Ratte nach Einwirkung von Diäthylenglykol.

Von
Hans Wegener.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Juli 1953.)

Der zweiwertige Ätheralkohol Diäthylenglykol $HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}OH$ soll nach den Untersuchungen von Holck bei Ratten, zu 5% dem festen Futter bzw. zu 0,5% dem Trinkwasser zugesetzt, sowohl die Sterblichkeit erhöhen und das Wachstum hemmen als auch die Fortpflanzungsfähigkeit der Versuchstiere beeinträchtigen oder gar aufheben. Diese Ergebnisse zu erweitern und etwaige durch Diäthylenglykol bedingte Schädigungen der generativen Funktionen bei Ratten zu erfassen, war Aufgabe der vorliegenden Untersuchung. Zum Vergleich wurde die Fertilität von Ratten herangezogen, denen in entsprechender Weise das als unschädlich geltende Glycerin oder als Kontrolle Aqua dest. verabfolgt wurde.

Methodisches.

Ausgegangen wurde von 30 männlichen und 30 weiblichen Albinoratten (P-Generation) gleicher Herkunft und gleichen Alters, die unter denselben Bedingungen gehalten und mit Speiseresten (Trinkwasser ad libitum) ernährt wurden. Je 10 Männchen und 10 Weibchen bildeten eine Gruppe; sämtliche Tiere wurden zunächst 8 Wochen lang in der Weise behandelt, daß die Ratten der ersten Gruppe täglich per os (Schlundsonde) 1,0 cm^3 einer 20%igen wäßrigen Lösung von Diäthylenglykol*, die der zweiten 1,0 cm^3 einer 20%igen wäßrigen Glycerinlösung und die der dritten Gruppe 1,0 cm^3 Aqua dest. je 100 g Körpergewicht erhielten. Die so vorbehandelten Tiere der P-Generation wurden innerhalb jeder Gruppe bei einem Gewicht der Weibchen von 170—215 g bei täglichem Wechsel der Männchen gepaart. Die erwähnte Schlundsondenfütterung wurde für 5 Weibchen je Gruppe bis zum Werfen und für die 5 restlichen weiblichen Ratten bis zum Abstillen der Jungen — Gesamtdauer der Behandlung mehr als 12 Wochen — fortgeführt, um auch eventuelle Schäden durch den Übertritt von Diäthylenglykol in die Milch erfassen zu können. Da sich jedoch innerhalb einer Gruppe für die Entwicklung der F_1-Generation kein von der Dauer der Fütterung abhängiger Unterschied ergab, werden im folgenden die Gruppen als Ganzes betrachtet. Während der Stillzeit wurden zusätzlich zu der angegebenen Kost Hafer, Lebertran und Standardbiskuits (siehe bei Loeser) verfüttert.

* „Diäthylenglykol rein", Anorgana G. m. b. H., Gendorf.

Das Wachstum der Jungtiere (F_1-Generation) wurde vom 15. bis zum 60. Lebenstag durch Kontrolle des Gewichtes in Abständen von 2 Tagen laufend verfolgt. Sobald das Gewicht etwa 60 g erreicht hatte, wurden die Jungen von den Muttertieren getrennt und bei den weiblichen Jungtieren das Einsetzen des Oestrus durch tägliche Scheidenabstriche ermittelt. Im Alter von etwa 100 Tagen wurde ein Teil der F_1-Generation getötet, die innersekretorischen Organe gewogen und histologisch untersucht.

10 männliche und 10 weibliche Tiere aus jeder F_1-Gruppe wurden bei einem Durchschnittsgewicht der Weibchen von 200 g gepaart und unter den gleichen Bedingungen wie die P-Generation gehalten. Im Gegensatz zu den Tieren der P-Generation blieben diese Ratten unbehandelt.

Von den F_2-Jungtieren wurden wie bei der F_1-Generation Gewichtskurven in jeder Gruppe aufgestellt, der Beginn der Brunst bestimmt und die innersekretorischen Organe von einem Teil der Tiere histologisch geprüft.

Ergebnisse.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Holck waren bei den unter den beschriebenen Bedingungen angestellten Fortpflanzungsversuchen weder gesundheitliche Schäden noch Störungen der Fruchtbarkeit nachzuweisen, gleichgültig, ob die Tiere mit Diäthylenglykol, Glycerin oder Aqua dest. behandelt worden waren (vgl. Loeser). Von den 10 weiblichen Ratten jeder Gruppe der P-Generation wurden bei Einwirkung von Diäthylenglykol alle — durchschnittliche Wurfzahl 9,9 —, bei Ein-

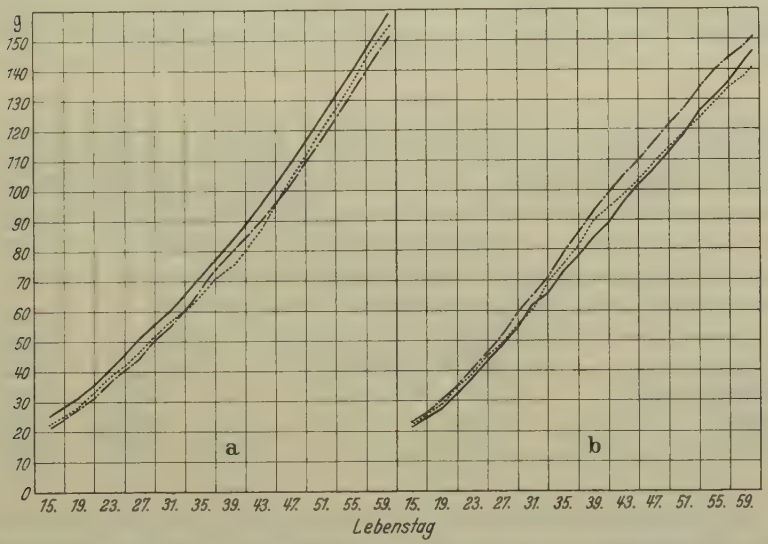


Abb. 1. Wachstumskurve von Jungratten (a = F_1-, b = F_2-Generation). Die männlichen und weiblichen Tiere der P-Generation hatten per os täglich 1 cm³ einer 20%igen wäßrigen Lösung von Diäthylenglykol bzw. Glycerin je 100 g Körpergewicht oder entsprechende Mengen Aqua dest. während eines Zeitraumes von etwa 12 Wochen erhalten. Ordinate: Mittelgewicht je Gruppe in Gramm. Abszisse: Lebensalter in Tagen. —·—·— Diäthylenglykoltiere [Mittelgewicht (a) von 45 ♂, 40 ♀; (b) von 31 ♂, 28 ♀]; ····· Glycerintiere [Mittelgewicht (a) von 41 ♂, 43 ♀; (b) von 47 ♂, 25 ♀]; — — — — Wassertiere [Mittelgewicht (a) von 39 ♂, 32 ♀; (b) von 24 ♂, 25 ♀].

wirkung von Glycerin ebenfalls alle — durchschnittliche Wurfzahl 9,0 — und bei Verfütterung von Aqua dest. 9 Tiere — durchschnittliche Wurfzahl 8,1 — trächtig.

Von den Jungtieren (F_1) starben bis zum 50. Lebenstag 6 Ratten der Diäthylenglykol-, 12 der Glycerin- und 3 der Wassergruppe. Die Gewichtszunahme (Abb. 1a) einer jeden Gruppe erfolgte kontinuierlich und war einander weitgehend gleich.

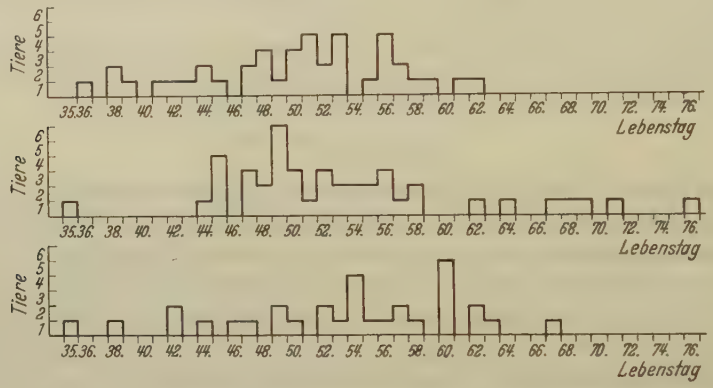


Abb. 2. Einsetzen des Oestrus bei Ratten der F_1-Generation. Ordinate: Anzahl der Tiere mit erstmaligem Schollenstadium. Abszisse: Alter der Tiere in Tagen. *Oben:* Jungtiere, deren Eltern mit Diäthylenglykol, *Mitte:* Jungtiere, deren Eltern mit Glycerin, *Unten:* Jungtiere, deren Eltern mit Wasser behandelt waren (Einzelheiten siehe Methode).

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, trat der Oestrus bei Ratten der verschiedenen Gruppen praktisch zur gleichen Zeit ein. Die Feinstruktur der innersekretorischen Organe war normal. Eine gute Übereinstimmung bestand auch hinsichtlich der an jeweils 26 Tieren ermittelten und auf 100 g Körpergewicht bezogenen durchschnittlichen Gewichte von Hypophyse, Schilddrüse, Nebennieren, Ovarien und Hoden. So betrug das Organgewicht (in mg) bei den einzelnen Versuchsgruppen

	Hypophyse	Schilddrüse	Nebennieren	Ovarien	Hoden
Diäthylenglykol	3,2	9,2	18,7	31,2	1030
Glycerin	3,4	9,1	19,0	36,5	1080
Aqua dest.	3,16	8.7	18,9	31,3	1100

In der zweiten Generation (F_1) wurden von 10 weiblichen Ratten, deren Eltern Diäthylenglykol erhalten hatten, 10 Tiere — durchschnittliche Wurfzahl 9,2 —, von 10 Ratten, deren Eltern mit Glycerin behandelt worden waren, 9 Tiere — durchschnittliche Wurfzahl 8,7 — und von den Ratten, deren Eltern als Kontrollen (Aqua dest.) gedient hatten, 10 Tiere — durchschnittliche Wurfzahl 8,1 — trächtig.

Die Gewichtszunahme der Jungtiere (F_2) einer jeden Gruppe war stetig und für „Diäthylenglykol-" und „Glycerintiere" fast übereinstimmend (Abb. 1b). Das Oestrus-Diagramm entsprach im wesentlichen dem der F_1-Tiere; die histologischen Untersuchungen der innersekretorischen Organe ergaben bei diesen Gruppen ebenfalls keine Abweichungen.

Zusammenfassung.

Über einen Zeitraum von 8 Monaten an etwa 560 Ratten vergleichend durchgeführte Züchtungsversuche lassen keine Schädigung der Fortpflanzungsfähigkeit durch eine vorausgegangene 12wöchige Behandlung der Elterntiere mit Diäthylenglykol (täglich 1,0 cm^3 einer 20%igen Lösung je 100 g) erkennen, obwohl die zugeführte Gesamtmenge ein mehrfaches derjenigen ist, die in den Versuchen von Holck die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigte oder aufhob. Versuchs-, Vergleichs- (Glycerin) und Kontroll- (Wasser) Tiere wurden in fast gleicher Zahl trächtig. Die Wurfgröße betrug durchschnittlich 8—10 Junge. Diese zeigten regelmäßige und gleichartige Entwicklung. Wachstum und Reife (Einsetzen des Oestrus) waren ungestört; die innersekretorischen Organe ließen hinsichtlich Gewicht und Feinstruktur keine Unterschiede erkennen. Aufnahmefähigkeit und Wurfzahl der unbehandelten F_1-Generation glichen denjenigen der P-Tiere. Entsprechend verhielt sich die F_2-Generation, auch hier fand sich kein Anhalt für die Manifestation von Keimschäden.

Literatur.

Holck, H. G. O.: Glycerin, Ethylene Glycol, Propylene Glycol and Diethylene Glycol. J. Amer. Med. Assoc. **109**, 1517 (1937). — Loeser, A.: Diäthylenglykol, neuere Beiträge zur Pharmakologie und Toxikologie der Polyglykole. Arch. exper. Path. u. Pharmakol.: in Vorbereitung.

Dr. Hans Wegener, Pharmakol. Institut d. Univ., Münster i. W.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 418—422 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. Janssen)
und dem Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. Lüttringhaus)
der Universität Freiburg i. Breisgau.

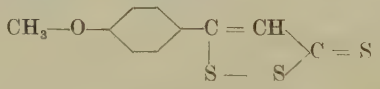
Die Elimination von Trithionderivaten in der Galle.

Von
Alfred Enders und Renate Deckert.

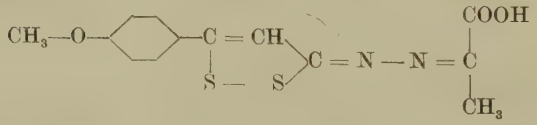
Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juli 1953.)

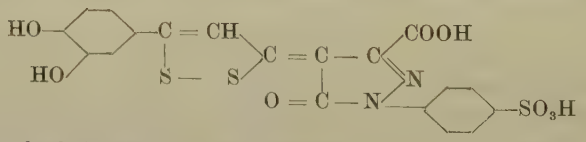
Nach Halpern und Gaudin verursacht die Substanz Trithio-p-methoxyphenylpropan (Anetholtrithion) beim Hund in Dosen von 2 bis 3 mg/kg eine starke Vermehrung der Gallensekretion. Enders untersuchte die choleretische Wirksamkeit von 8 Derivaten des Anetholtrithions, die im Chemischen Institut Freiburg von Lüttringhaus, Schmidt und Hübinger synthetisiert wurden. Sämtliche Substanzen vermehrten die Galleproduktion; nach einer intramuskulären oder intraduodenalen Applikation schienen sie auch mit der Galle ausgeschieden zu werden, diese war nämlich nach der Applikation einiger dieser Substanzen rötlich gefärbt, entsprechend der gelblichröten Farbe dieser Trithionderivate. Es schien daher möglich, die Ausscheidung in der Galle quantitativ zu bestimmen. Bei der Langwierigkeit derartiger Untersuchungen verzichteten wir darauf, alle 8 Substanzen zu prüfen. Wir wählten 2 Derivate, Lü 100 und Lü 104 (s. nachstehende Formel). Von



Anetholtrithion



Lü 100 Gemischtes Azin der Brenztraubensäure und des Anetholtrithions
bzw. Brenztraubensäure-3-(p-Methoxyphenyl)-4,5-Dithiacyclopentenon-1-azin



Lü 104 Pyrazolonfarbstoff des Anetholtrithions
bzw. 1-(3-p-Methoxyphenyl-4,5-dithiacyclopenten)
4-(1-p-Sulfophenyl-3-carboxy-pyrazolon-5)-Merocyanin

diesen beiden besitzt das Brenztraubensäurederivat (Lü 100) eine sehr starke choleretische Wirkung, während das Pyrazolonderivat des Anetholtrithions (Lü 104) die Galleproduktion nur wenig beeinflußt. Lü 100 wirkt an der Katze in Dosen von 30 mg/kg bei intramuskulärer Injektion, in Dosen von 10 mg/kg bei intraduodenaler Applikation choleretisch. Lü 104 rief erst in Dosen von 200 mg/kg bei intraduodenaler Verabreichung eine mäßige Förderung der Cholerese hervor. Diese beiden Substanzen zeichneten sich somit in der Reihe der choleretisch wirksamen Trithionderivate durch sehr starke und auf der anderen Seite sehr schwache Wirksamkeit aus. Sie ließen bei einer Untersuchung der quantitativen Ausscheidungsverhältnisse besonders aufschlußreiche Ergebnisse erwarten.

Methodik.

Lü 100 wurde in 1%iger Lösung verwendet; als Lösungsmittel diente 20%iges 1,2-Propylenglykol. Lü 104 war bis zu 10% in Wasser löslich. Die Lösungen wurden entweder i. m. injiziert oder in das Duodenum infundiert. Als Versuchstiere dienten 18 Katzen, die mit Numal (0,6 cm^3/kg der 10%igen Lösung i. p.) narkotisiert waren. Nach Abbinden der Gallenblase wurde in den Ductus choledochus eine Kanüle eingebunden und die Galle in ein Sammelgefäß geleitet.

Sämtliche Versuchstiere erhielten vor der Operation 1 mg/kg Atropin s. c., um Kreislaufschäden während und nach der Bauchoperation zu vermeiden. Da wir ferner beobachtet hatten (Enders), daß Lü 100 den Blutdruck senkt, gaben wir während des Versuchs 1 mg/kg Veritol s. c. in der Stunde. Die gewählten Dosen von Lü 100 und Lü 104 lagen mit 30—100 mg/kg sehr hoch und bei Lü 100 weit über den choleretisch wirksamen Mengen. Wir applizierten so hohe Dosen, um für den Nachweis in der Galle möglichst große Mengen zu gewinnen. Aus dem gleichen Grunde injizierten wir außer den Substanzen Lü 100 und Lü 104 noch jede Stunde 10 mg/kg Decholin i. m. und erzielten dadurch einen maximalen Gallefluß, d. h. eine genügende Menge Galle zur Untersuchung. Letztere Maßnahme verwischte freilich die den Anetholtrithionderivaten eigene Sekretionswirkung; sie schien aber vertretbar, da ihr Ausmaß aus Untersuchungen von Enders bereits bekannt war. Somit war deren Unterstützung durch Verabreichung von Gallensäuren nur eine Verstärkung der natürlichen Sekretion der Leber.

Vor jeder Injektion der Trithionsubstanzen wurde die innerhalb 3 Std produzierte Galle als Vergleichslösung bei der später geschilderten Bestimmung von Lü100 und Lü 104 verwendet. Nach der Injektion wurde die ausfließende Gallenmenge von der 1.—3. und von der 4.—6. Std getrennt gesammelt. Nach Abschluß jeder Sammelperiode wurde der Schlauch und die Kanüle mit konstanten Wassermengen gespült.

Dabei wurden die aus Untersuchungen von Deckert bekannten Absorptionsspektren der beiden Stoffe im UV-Licht und im sichtbaren Licht benutzt. Die Lage der Absorptionsmaxima ist durch die Konstitution der Substanzen gegeben. Zur Bestimmung der Konzentration diente das Gesetz von Lambert-Beer:

$$\varepsilon = \log J_o/J \cdot \frac{1}{c \cdot d}$$

(ε: Extinktionskoeffizient; c: Konzentration in gramm-Mol/l; d: Schichtdicke in Zentimeter; J/J_o: Durchlässigkeit; $\log J_o/J$: Extinktion).

Ist also der Extinktionskoeffizient bekannt, dann kann man durch Verwendung dieser Gleichung und Messung der Extinktion an den beiden Maxima die unbekannte

Konzentration bestimmen. Die Messungen wurden mit dem Beckmann-Spektrophotometer ausgeführt[1]. Um die ε-Werte an den Maxima zu bestimmen, wurden zunächst die Spektren der Reinsubstanzen in wäßriger Lösung aufgenommen (siehe Abb. 1 und 2). Die in der Galleflüssigkeit zu bestimmende Substanz wurde stets gegen die reine Galle desselben Versuchstiers gemessen, wobei keine nennenswerte Verschiebung des Spektrums gegenüber dem der reinen Substanzen in Wasser beobachtet wurde.

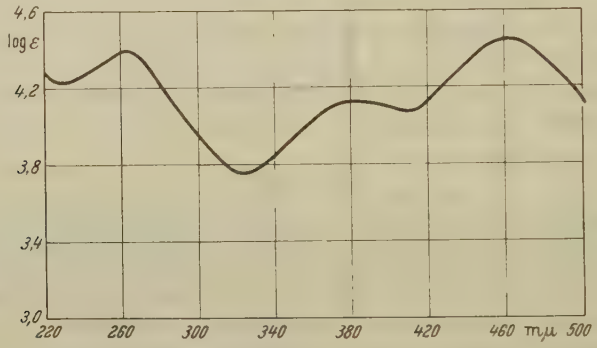


Abb. 1. Lü 104 Maxima: λ: 260 mμ ε: 25610; λ: 460 mμ ε: 27590.

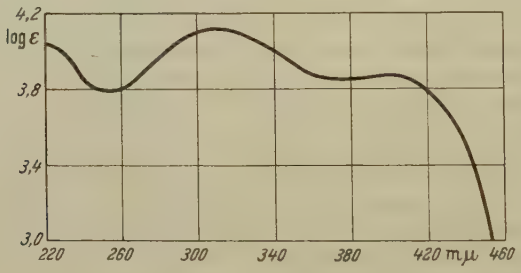


Abb. 2. Lü 100 Maxima: λ: 310 mμ ε: 13520; λ: 400 mμ ε: 9980.

Eine solche Konzentrationsbestimmung sei an folgendem Beispiel erläutert. Das Beispiel bezieht sich auf den in der Tab. 2, Zeile 7, zweitem Wert, angegebenen Versuch.

Beispiel.

Lü 100, 100 mg injiziert. Das Gesamtvolumen der gewonnenen Galleflüssigkeit nach 3 Std betrug 9 cm³.

Die Vergleichsgalle und die Meßlösung wurden in der gleichen Weise verdünnt: 1 cm³ auf 100 cm³. Schichtdicke betrug 1 cm (s. Tab. 1).

In der gesamten Galleflüssigkeit: $1{,}01 \cdot 9 = 9{,}09$ mg. Die Ergebnisse unserer Bestimmungen sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

[1] Herrn Prof. Dr. Mecke sind wir für die Überlassung des Geräts zu großem Dank verpflichtet.

Aus dieser Tabelle ergibt sich zunächst, daß die einzelnen Werte eine große Streuung zeigen. Um so auffälliger ist, daß trotz dieser Streuung die durchschnittliche Ausscheidung von Lü 100 bei intramuskulärer und intraduodenaler Applikation sogar größenordnungsmäßig weit höher liegt als die von Lü 104.

Tabelle 1.

λ	ε	J/J_o %	$\log J_o/J$	$c = \log J_o/J \cdot \frac{1}{E}$ Molekulargewicht	c
310	13520	37,0	0,432	$3{,}2 \cdot 10^{-5} \cdot 308 =$	0,0099 gMol/l
					0,99 mg/100 cm³
400	9980	45,2	0,345	$3{,}4 \cdot 10^{-5} \cdot 308 =$	0,0104 gMol/l
					1,04 mg/100 cm³
				Mittelwert	1,01 mg/100 cm³

Tabelle 2.

Substanz und Applikationsart	Dosis mg pro kg	Ausgeschiedene Menge in mg		Gesamtausscheidung in % der appliz. Menge
		1–3 Std	4–6 Std	
Lü 100 i. m. . . .	50	4	7	22
	50	3	8	22
	50	5	11	32
	50	6	8	28
	30	3	5	27
	30	1	4	17
				Durchschnitt 25%
Lü 100 i. d.	50	6	9	30
	50	5	8	26
	50	3	4	14
	30	2	3	17
	30	3	5	27
	30	3	6	30
				Durchschnitt 24%
Lü 104 i. d.	100	1,0	1,5	2,5
	100	0,5	1,5	2,0
	50	1,0	1,5	5,0
	50	0,2	0,2	0,8
	50	0,7	1,0	3,4
	50	0,4	1,0	2,8
				Durchschnitt 2,8%

Diskussion.

Unsere Versuche beweisen, daß von dem stark choleretisch wirkenden Stoff Lü 100 ein etwa 10fach größerer Prozentsatz als von dem choleretisch wirksamen Stoff Lü 104 ausgeschieden wird. Somit scheinen bei

diesen Trithionderivaten Sekretionsförderung und Eliminationsgröße parallel zu gehen. Dies erfolgt ohne Zusammenhang mit dem ausgeschiedenen Gallevolumen, das bei unserer Versuchsanordnung nach Injektion beider Substanzen etwa gleich groß war und in seiner Menge vor allem durch die gleichzeitig injizierten Gallensäuren bestimmt wurde. Die choleretisch stark wirksame Substanz Lü 100 wird also nicht nur in 10fach größerer Menge, sondern auch in 10fach größerer Konzentration ausgeschieden. Sie ist „gallefähiger" als die Substanz Lü 104.

Letztere Eigenschaft muß auf einer spezifischen Affinität zur Leber beruhen, da einer Ausscheidung die entsprechende Adsorption an das Lebergewebe aus dem Kreislauf vorangehen muß. In diesem Zusammenhang scheint die Tatsache wichtig, daß das Lebergewicht der Katze etwa 3% des gesamten Körpergewichts beträgt; wird von der schwach choleretisch wirksamen Substanz Lü 104 ebenfalls etwa 3% der applizierten Menge mit der Galle eliminiert, dann kann man weiter schließen, daß sich diese Substanz ohne spezifische Affinität zur Leber gleichmäßig auf alle Körpergewebe verteilt. Dagegen wird die Substanz Lü 100 bei einer Ausscheidung von 25% etwa 10mal so stark an die Leber als an die übrigen Gewebe adsorbiert, d. h. sie besitzt eine spezifische Affinität zum Lebergewebe.

Zusammenfassung.

Das choleretisch stark wirksame Brenztraubensäurederivat des Anetholtrithions wird mit der Galle in 10fach stärkerer Konzentration und Menge ausgeschieden als das choleretisch schwach wirksame Pyrazolonderivat des Anetholtrithions.

Die Untersuchungen wurden mit der Unterstützung der Freiburger Wissenschaftlichen Gesellschaft durchgeführt; wir sprechen dieser Institution für ihre großzügige Hilfe den besten Dank aus.

Literatur.

Deckert, R.: Dissertation, noch nicht veröffentlicht. — Enders, A.: Arzneimittelforschung, im Druck. — Halpern, B., u. O. Gaudin: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 49 (1950).

Doz. Dr. A. Enders, 17b, Memmingen/Allgäu, p. Adr. Firma Gödecke & Co., Chemische Fabrik A. G.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 423—432 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Über die Wirkung von Nicotin auf das Rückenmark der Katze. Einflüsse von Nicotin auf Patellarsehnen-, Flexor- und Extensorreflex vor und nach Zufuhr von Interneuronengiften.

Von
Roland Taugner und Walli Culp.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Juli 1953.)

Im Gegensatz zu den Verhältnissen an autonomen Ganglien ist die Wirkung von Nicotin auf das Zentralnervensystem (ZNS) noch umstritten. So wird die entscheidende Frage, ob Nicotin die synaptische Übertragung im ZNS verbessert, verschlechtert oder überhaupt nicht beeinflußt, verschieden beantwortet.

Entsprechend der zusammenfassenden Darstellung von Dixon soll Nicotin beim Frosch die motorischen Vorderhornzellen zunächst erregen, dann lähmen können. Bonnet und Bremer fanden später beim Kaltblütler in der Verlängerung von Nachentladungen ebenfalls Anzeichen für erregende Nicotinwirkungen, wahrscheinlich auf die Interneuronen des Rückenmarks (RM). Über die Lähmung zentraler Synapsen beim Krebs vgl. dagegen Wiersma und Schallek.

Die allgemeine Erregung des ZNS von Warmblütlern durch Nicotin (Muskelzuckungen, Krämpfe, Opisthotonus) war seit langem bekannt (v. Praag, Krocker, Truhart). Nicotinkrämpfe von Ratten lassen sich sogar zur Testierung von Stoffen mit Antinicotinwirkung ausnützen (vgl. Eichholtz 1953). Lähmende Wirkungen größerer Dosen sollten nicht auf zentralen, sondern auf peripheren, „curareartigen" Effekten beruhen (betr. RM-Reflexe vgl. Langley und Dickinson, für die Atmung vgl. Thomas und Franke sowie Gold und Modell).

Schweitzer und Wright fanden dagegen am Patellarsehnenreflex (PSR) von Katzen ausschließlich zentrale Lähmungen durch Nicotin, unter Umständen schon in Dosen von 1—2 γ/kg. Der PSR wurde von ihnen als „typischer spinaler Reflex" bezeichnet und Nicotin unter diejenigen Pharmaka eingereiht, welche das RM der Warmblütler lähmen. Inzwischen hat jedoch die verfeinerte pharmakologische Analyse ergeben, daß einzelne RM-Reflexe auf verschiedene Stoffe unterschiedlich, ja sogar gegensinnig reagieren können (Berger, Wikler, Merlis und Lawson). Libet und Gerard fanden zwar an Katzen bei i. v. Injektion von 2,5 mg Nicotin/kg — in Analogie zu den Befunden von Schweitzer und Wright am PSR — eine Unterdrückung gekreuzter und ungekreuzter RM-Reflexe, doch ergeben sich aus den Untersuchungen von Bülbring und Burn sowie van Harreveld und Feigen Hinweise darauf, daß der homolaterale Flexorreflex (FlR) nach einer initialen Abschwächung durch Nicotin verbessert werden kann. Vollständige Unterdrückung des FlR soll nach van Harreveld erst bei 20 mg Nicotin eintreten, einer Dosis, welche schon zum Versagen der indirekten Muskelerregbarkeit führt. Die Reaktion des kontralateralen Extensorreflexes (ER) wurde bisher nicht näher studiert.

Im Gegensatz zu Schweitzer und Wright verwendeten alle anderen Autoren relativ hohe Nicotindosen, van Harreveld und Feigen sogar 5—200 mg/kg. Die große Mehrzahl aller Versuche wurde außerdem an narkotisierten Tieren durchgeführt. Wir stellten uns daher die Frage, ob — in Übereinstimmung mit den alten Erfahrungen am ganzen Tier — kleine Nicotindosen bei decerebrierten Katzen primär zu einer Steigerung multisynaptischer Reflexe (FlR und ER) führen können. Zur näheren Bestimmung des Angriffspunktes sollte außerdem geprüft werden, ob Nicotin die Lähmung der Interneuronen durch Parpanit[1] bzw. MY 301[2] antagonistisch beeinflussen kann.

Das Auffinden antagonistischer Wirkungen von Nicotin gegenüber Parpanit und MY 301 sowie erregender Effekte kleiner Dosen auf FlR und ER (und damit wahrscheinlich auf die Interneuronen des RM) führte zu einem weiteren Problem: Es bestand die Möglichkeit, daß die Unterdrückung des PSR durch Nicotin nicht direkt, über eine Lähmung des Reflexbogens, sondern indirekt, durch Erregung höherer RM-Abschnitte mit hemmender Wirkung auf diesen zustande kommt. Van Harreveld vermutete schon auf Grund der verschiedenen Empfindlichkeit von PSR und FlR, daß die lähmenden Effekte von Nicotin am PSR nicht auf Veränderungen der synaptischen Übertragung, sondern auf irgendwelchen Nebenwirkungen beruhen. Wir prüften daher, ob die Nicotinlähmung des PSR durch vorherige Gaben von Parpanit oder MY 301 antagonistisch beeinflußt werden kann.

Versuchsanordnung.

Zur Verwendung kamen Katzen im Gewicht von 2,2—3,8 kg. Die Mehrzahl der Tiere wurde — in Äthernarkose — nach Sherrington decerebriert und künstlich beatmet. Von Beendigung der Ätherzufuhr bis Versuchsbeginn vergingen etwa 2 Std. Bei einem Teil der decerebrierten Tiere durchtrennten wir — ebenfalls in Äthernarkose — 24 Std vorher das RM im Bereich der unteren Thorakalsegmente. Einige nicht decerebrierte Katzen waren mit Urethan-Chloralose (250 bzw. 60 mg/kg subcutan) narkotisiert.

Blutdruckregistrierungen erfolgten mit Hilfe eines Quecksilbermanometers über die Carotis. Zur Verhinderung der Blutgerinnung diente Thrombocid[3].

FlR und ER wurden durch elektrische Reizung der zentralen Stümpfe von Peronaeus und Tibialis in der linken Kniekehle ausgelöst. Auf der rechten Seite (ER) durchtrennten wir möglichst weit zentral Obturatorius, Ischiadicus und Saphenus, auf der linken (FlR) Obturatorius, Femoralis und Saphenus. Durch beide Kniegelenke wurden kräftige Stahlnadeln getrieben und in Metallbügeln fixiert. Diese

[1] = 1-Phenylcyclopentan-1-carbonsäurediäthylaminoäthylester-HCl.

[2] MY 301, der Guajakoläther des Glycerins, ist in seinen Wirkungen dem o-Kresoläther (Myanesin) ähnlich (Gycha). Das Präparat wurde uns freundlicherweise von der Fa. Dr. Christian Brunnengräber, Lübeck, zur Verfügung gestellt.

[3] Thrombocid wurde uns freundlicherweise von der Fa. Dr. W. Benend, München-Solln, zur Verfügung gestellt und hat sich sehr gut bewährt. Wir füllten jeweils 0,5—1 cm³ einer 5%igen Lösung in die Blutdruckkanüle ein.

Nadeln dienten als Drehpunkte für die Unterschenkel der hinteren Extremitäten. Beide Fußgelenke waren mit modifizierten Keith-Lucas-Hebeln verbunden. Die Hebelbelastung wurde je nach Tiergröße variiert.

In verschiedenen Versuchen wurde der PSR der linken Seite (alternierend mit dem ER) durch einen automatischen Reflexhammer ausgelöst. Zum Vergleich registrierten wir außerdem die Kontraktionen des Triceps brachii bei elektrischer Reizung des peripheren Radialisstumpfes. Der die Insertionsstelle tragende Processus olecrani wurde mit einer Luerschen Zange abgetrennt und ebenfalls mit einem Keith-Lucas-Hebel verbunden. Ulnaris, Medianus und Musculocutaneus waren durchschnitten, der Vorderarm in einer Klemme fixiert. Alle Registrierungen wurden auf einem Rußkymographion vorgenommen.

Die elektrische Reizung von Radialis sowie Peronaeus und Tibialis erfolgte über Platinelektroden mit einer Hülle aus Kunststoff. Wiederholte Kontrollen schlossen das Übertreten von Stromschleifen in die Umgebung aus. Wir verwendeten das große Reizgerät der Fa. MEDEOR-Hamburg. Die Dauer der Rechteckimpulse betrug 4 msec, die Reizfrequenz 50/sec, die Reizstärke 0,25 –2 mA. Durch einen Unterbrecher wurde der Stromkreis, in welchem sich beide Elektroden befanden, pro Minute einmal für je 2 sec geschlossen. In Alternation mit der elektrischen Reizung wurde der PSR, ebenfalls einmal pro Minute, ausgelöst.

Um Einflüsse der durch Nicotin verursachten Adrenalinausschüttung auszuschließen, entfernten wir die Nebennieren einiger Katzen kurz vor Versuchsbeginn.

Sank der Blutdruck decerebrierter Tiere unter die von Koll angegebene Schwelle, so wurde er meist durch i. v. Infusion einer Adrenalinlösung 1:10000 auf Werte zwischen 80 und 120 mm Hg eingestellt. Die Ergebnisse wurden dadurch nicht deutlich verändert.

I. v. Injektionen von Nicotintartrat (1:1000—1:10000), Strychninnitrat (1:10000), MY 301 (5%) bzw. Parpanit (1%) erfolgten in eine Jugularvene. Das Nicotintartrat wurde nach den Angaben von Forst gereinigt.

Versuchsergebnisse.

Die Wirkung von Nicotin auf den PSR. I. v. Injektionen von 20 bis 500 γ Nicotin/kg führten zu einer *Verminderung* des PSR (Tab. 1, Abb. 3). Der Höhepunkt dieser Lähmung war spätestens nach 2 min erreicht. Die Erholung dauerte, je nach Dosierung, bis zu 30 min.

Die Verminderung des PSR war weitgehend unabhängig von einzelnen Versuchsbedingungen wie Narkose, Decerebrierung, Durchtrennung des RM, Ausschaltung der Nebennieren, Veränderungen von Blutdruck und Atmung. Die Kontraktionshöhe des indirekt gereizten Muskels wurde durch die verwendeten Nicotindosen nicht verändert. Es handelt sich demnach bei der Lähmung des PSR — entsprechend der Auffassung von Schweitzer und Wright — zweifellos um zentrale Wirkungen von Nicotin auf das RM.

Die Wirkung von Nicotin auf den homolateralen Flexorreflex. Der typische Effekt bestand hier — im Gegensatz zu den Verhältnissen am PSR — in einer *Verbesserung* der Amplituden, besonders deutlich bei i .v. Injektionen von 100—1000 γ Nicotin/kg (Tab. 1, Abb. 1). Diese Wirkung trat nach 30—60 sec ein und dauerte, je nach Dosierung, 6—10 min. Die Nicotininjektion führte in einigen Fällen gleichzeitig zu einer Steigerung

des Flexorentonus, häufiger — wahrscheinlich als Folge von Nachentladungen — zur verlangsamten Erschlaffung der Beuger (Abb. 1). Die Verbesserung des FlR erfolgte ohne die von Bülbring und Burn sowie van Harreveld und Feigen bei größeren Nicotindosen registrierte initiale Verschlechterung. Wir beobachteten nur in einem einzigen Fall eine Verminderung des FlR, und zwar durch 250 γ Nicotin (Tab. 1).

Tabelle 1. *Die Wirkung von Nicotin auf Patellarsehnenreflex, Flexor- und Extensorreflex der decerebrierten Katze*[1].

Dosis γ/kg i.v.	Patellarsehnenreflex					Flexorreflex					Extensorreflex				
	Anzahl der		Verminderung	kein Effekt	Verbesserung	Anzahl der		Verminderung	kein Effekt	Verbesserung	Anzahl der		Verminderung	kein Effekt	Verbesserung
	Tiere	Injektionen				Tiere	Injektionen				Tiere	Injektionen			
10	1	1	—	1	—	5	5	—	5	—	4	4	—	4	—
20	3	5	4	1	—	2	2	—	2	—	1	1	—	1	—
50	3	3	1	2	—	10	10	—	8	2	9	9	—	4	5 (2)[2]
100	7	11	9	2	—	12	14	—	8	6	11	14	1	6	7 (2)
250	9	24	24	—	—	19	43	1	20	22	18	35	4	6	25 (9)
500	3	4	4	—	—	7	20	—	3	17	7	19	3	1	15 (11)
1000	—	—	—	—	—	3	3	—	—	3	1	1	1	—	—

[1] Bei einem Teil der Tiere war das Rückenmark durchtrennt.

[2] In Klammern die Anzahl der Versuche, bei welchen eine initiale Verminderung des Extensorreflexes auftrat.

Die Wirkung von Nicotin auf den kontralateralen Extensorreflex. Auch der ER reagierte auf unsere Nicotindosen meist mit einer *Verbesserung* der Amplituden (Tab. 1, Abb. 1). In einigen Versuchen traten jedoch vor der Verbesserung kurzdauernde, initiale Verschlechterungen des ER auf (Abb. 1). Verminderungen der Reflexamplitude ohne nachträgliche Verbesserung kamen nur sehr selten vor. Im Gegensatz zum Flexorentonus wurde derjenige der Extensoren unter Umständen abgeschwächt (Abb.1). Deutlicher war dieser Effekt bei decerebrierten Tieren mit intaktem RM: Die Extensorenstarre wurde durch 250 γ Nicotin für einige Minuten aufgehoben, bzw. stark vermindert.

Die Wirkung von Nicotin auf FlR und ER unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Die verbessernde Wirkung von Nicotin auf FlR und ER war von der Adrenalinausschüttung unabhängig: Sie trat auch nach Entfernung der Nebennieren ein. Ausschaltung der Carotissinus, Vagotomie, Decerebrierung und Durchtrennung des RM waren ebenfalls ohne Bedeutung. Einflüsse veränderter Atmung wurden durch künstliche Ventilation ausgeschlossen. Es kann daher wohl kein Zweifel bestehen,

daß es sich auch bei der Verbesserung von FlR und ER um direkte Wirkungen von Nicotin auf das RM handelt.

Im Vergleich zu den Untersuchungen von Eichholtz u. Mitarb. (a und b), welche bei Ratten eine Verstärkung von Nicotin- und Strychninkrämpfen durch CO_2-Beatmung beobachtet hatten, prüften wir, ob CO_2 die Wirkung von Nicotin und Strychnin auf PSR, FlR und ER verändern kann. CO_2-Beatmung (2,5 –30% mit O_2) führte bei decerebrierten Katzen in keinem Fall zu Verbesserungen von PSR, FlR und ER. 10—30% CO_2 verminderten in einigen Fällen die Reflexamplituden. Im Gegensatz zu den Angaben von McDowall kam es bei decerebrierten Tieren durch die Beatmung mit CO_2 (3—30%) zu einem Nachlassen von Extensorentonus und Enthirnungsstarre.

Die Wirkung von Nicotin auf PSR, FlR und ER wurde durch die erwähnten CO_2-Konzentrationen nicht verändert. Dasselbe gilt nach informatorischen Versuchen auch für die Wirkung von 10—15 γ Strychnin/kg. Die Extensorenstarre decerebrierter Tiere wurde durch Strychnin (im Gegensatz zu Nicotin) verstärkt.

Die Wirkung von Nicotin auf FlR, ER und PSR nach vorheriger Gabe von Parpanit bzw. MY 301.

Zunächst studierten wir die Wirkung von Parpanit und des in dieser Hinsicht noch nicht näher analysierten MY 301 auf PSR, FlR, ER und indirekt gereizten Skeletmuskel. Parpanit (3—8 mg/kg) bzw. MY 301 (10—20 mg/kg, jeweils in 1 bis 2 min i. v.) führten zu der für Interneuronengifte charakteristischen elektiven Abschwächung von FlR und ER. Der FlR erwies sich dabei wesentlich resistenter als der ER: Dieser wurde durch die angeführten Dosen immer ausgelöscht bzw. stark abgeschwächt, während es beim FlR nur in etwa der Hälfte aller Fälle zu einer deutlichen Verminderung kam (vgl. Berger).

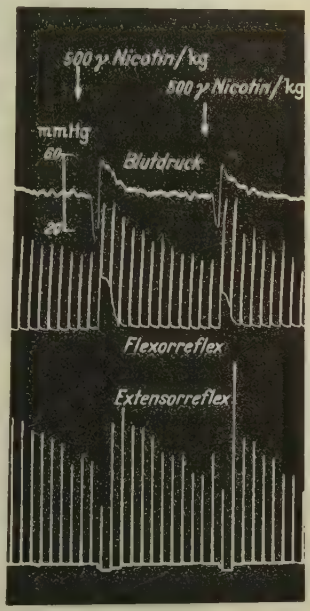


Abb. 1. Decerebrierte Katze, 3,3 kg, mit durchtrenntem Rückenmark. Künstliche Beatmung. Auslösung der Reflexe einmal pro Minute. 500 γ Nicotin/kg i.v. führen zur Verbesserung der Reflexamplituden sowie zu Veränderungen von Flexoren- und Extensorentonus. Initiale Verschlechterung des ER.

Es ist bekannt, daß eine 2. Injektion von Parpanit beim selben Tier schwächer wirkt. Dasselbe gilt nach unseren Versuchen auch für MY 301. Diese — zu wenig beachtete — „Tachyphylaxie" trat bei unseren Versuchen sehr schnell ein und führte z. B. bei Dauerinfusionen zu einer weitgehenden Resistenz: So kam es bei zwei decerebrierten Tieren nach Zufuhr von 105 bzw. 150 mg Parpanit/kg (in 42 bzw. 25 min) weder am FlR noch am ER zu einer deutlichen Verkleinerung der Amplituden. In einem Fall kehrte sogar die Extensorenstarre während der Infusion wieder. Noch höhere Dosen verbieten sich wegen der nachteiligen Kreislaufeffekte. Die Wirkungsdauer einmaliger i. v. Injektionen von Parpanit bzw. MY 301 reichte jedoch meist aus, um die Beeinflussung der Nicotinwirkung studieren zu können.

Wir untersuchten zunächst die Wirkung von Nicotin auf *FlR und ER* nach vorheriger Gabe von Parpanit oder MY 301. Es ergab sich dabei ein

deutlicher Antagonismus zwischen Nicotin und Interneuronengiften: 100 bis 250 γ Nicotin verbesserten den durch Parpanit (8 mg) bzw. MY 301 (20 mg/kg) gelähmten ER in allen, den (ebenfalls gelähmten) FlR in 22 von 35 Fällen. Die erregende Wirkung von Nicotin war unter diesen Umständen sogar noch deutlicher als in den Versuchen ohne Interneuronengifte. Abb. 2 zeigt, daß schon 100 γ Nicotin genügen können, um

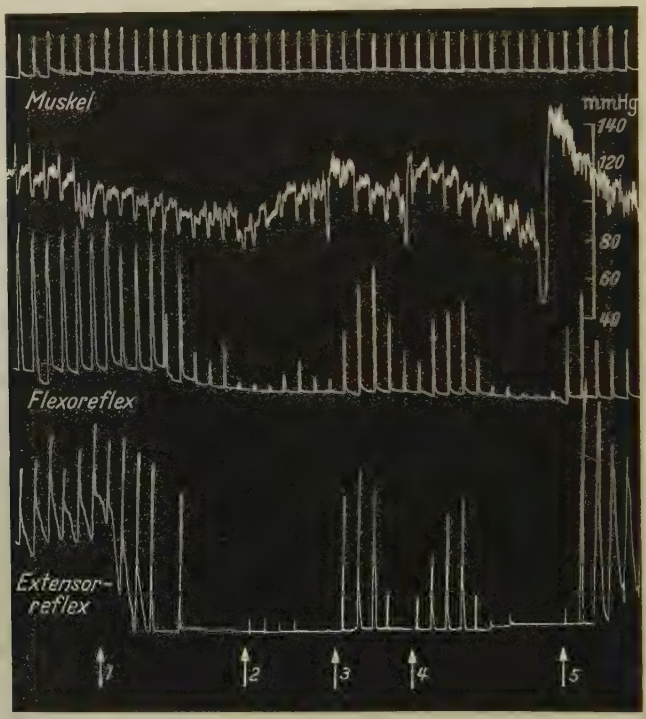


Abb. 2. Decerebrierte Katze, 3,5 kg, mit intaktem Rückenmark. Künstliche Beatmung. Elektrische Reizung einmal pro Minute. 20 mg MY 301/kg (*1*) lösen die Extensorenstarre und lähmen FlR und ER. 50 (*2*), 100 (*3*, *4*) und 250 γ Nicotin/kg (*5*) führen zu einer dosisabhängigen Restitution der Reflexe.

für die Dauer von 4—5 min zu einer weitgehenden Restitution der durch MY 301 gelähmten multisynaptischen Reflexe zu führen.

In besonderen Versuchen an Katzen in Urethan-Chloralose-Narkose prüften wir außerdem, ob der Antagonismus Interneuronengifte:Nicotin auch am *PSR* nachweisbar sei, d. h., ob hier die lähmende Wirkung von Nicotin durch vorherige Gaben von Parpanit oder MY 301 abgeschwächt werden kann. 20 bzw. 40 γ Nicotin führten entsprechend Abb. 3 zur typischen Verkleinerung der Reflexausschläge. Nach Injektionen von 8 mg Parpanit oder 40 mg MY 301 waren dieselben Nicotindosen ohne

deutliche Wirkung. Erst 250γ Nicotin führten zu einer deutlichen Lähmung. 20—40 min nach Zufuhr der Interneuronengifte waren auch die kleineren Nicotindosen (20—40γ) wieder wirksam (Abb. 3). Der beschriebene antagonistische Effekt war in manchen Fällen erst durch höhere Dosen von Parpanit (16 mg) oder MY 301 (60—80 mg) zu erzielen. Die lähmende Wirkung von Nicotinmengen zwischen 100 und 250γ/kg wurde aber auch dadurch nur abgeschwächt.

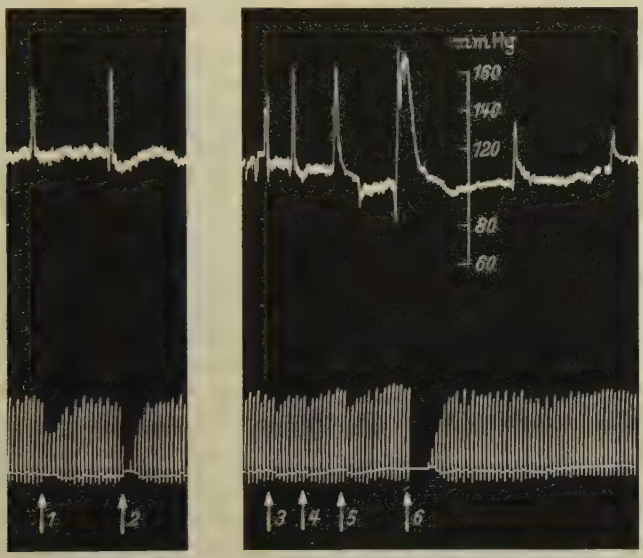


Abb. 3. Katze, 2,4 kg, in Urethan-Chloralose-Narkose. Oben: Blutdruck; unten: Patellarsehnenreflex, Auslösung 2 mal pro Minute. 20 und 40 γ Nicotin/kg (*1*, *2*) führen zu der charakteristischen Abschwächung des PSR. Zwischen A und B 40 mg MY 301/kg i.v. Nach MY 301 sind 20, 40 und 80 γ Nicotin (*3*, *4* und *5*) praktisch unwirksam. Erst 250 γ Nicotin (*6*) führen zu einer deutlichen Lähmung.

Diskussion.

Die beschriebenen Wirkungen von Nicotin an PSR, FlR und ER spielen sich mit größter Wahrscheinlichkeit im Rückenmark selbst ab. Irgendwelche Veränderungen peripherer Anteile des Reflexbogens erscheinen ausgeschlossen. Die Beteiligung viscerosomatischer Reflexe ist, vor allem bei den Tieren mit durchtrenntem RM, unwahrscheinlich. Wir stehen somit vor der Tatsache, daß Nicotin — ähnlich wie Eserin (Merlis und Lawson) — selektive Wirkungen auf bestimmte RM-Reflexe besitzt: Die nämlichen kleinen Nicotindosen, welche den PSR vermindern, führen nach unseren Untersuchungen zu einer Verbesserung von FlR und ER.

Die Befunde an FlR und ER stehen im Einklang mit den alten Erfahrungen über erregende Wirkungen von Nicotin am ZNS des intakten Warmblütlers. Sie widersprechen außerdem der Auffassung, daß Nicotin

zu den rückenmarkslähmenden Stoffen gehört und weisen erneut darauf hin, daß die Wirkung eines Pharmakons durch das Studium einzelner RM-Reflexe nur unzulänglich charakterisiert werden kann.

Die ausschließlich verbessernde Wirkung kleiner Nicotindosen auf den FlR war früheren Untersuchern, welche meist höhere Dosen verwendeten, entgangen. Van Harreveld und Feigen sowie Bülbring und Burn hatten jedoch schon auf die verschiedene Empfindlichkeit von PSR und FlR gegenüber lähmenden Nicotinwirkungen hingewiesen. Nach unseren Untersuchungen wird auch der ER durch kleine Nicotindosen verbessert und erst durch Nicotindosen reduziert, welche etwa zehnmal höher liegen als die geringsten, am PSR wirksamen Mengen. Wir betrachten diesen großen Unterschied in der Nicotinempfindlichkeit, wobei der einfachere Reflex durch wesentlich kleinere Nicotindosen gelähmt wird als die komplizierten, als ersten Hinweis darauf, daß es sich bei der Lähmung des PSR einerseits und der multisynaptischen Reflexe andererseits um grundsätzlich verschiedene Vorgänge handelt.

Die gegensinnige Wirkung kleiner Nicotindosen auf PSR und FlR, also auf „antagonistische Reflexe" im Sinne von Sherrington und Mitarb., wäre leicht verständlich: Veränderungen eines Beugereflexes können mit reziproken Reaktionen des antagonistischen Streckreflexes einhergehen; Verbesserungen des ER bei gleichzeitiger Verschlechterung des PSR lassen sich jedoch auf diese Weise nicht erklären: Sowohl PSR als auch ER stellen Reaktionen des Quadriceps und somit höchstwahrscheinlich derselben Motoneuronen dar. Da sich demnach der Nicotineffekt vermutlich nicht an den Motoneuronen abspielt, dürfte die oben angeführte Erklärung auch für die gegensinnige Reaktion der antagonistischen FlR und PSR nicht zutreffen.

Merlis und Lawson ziehen aus den Wirkungen von Eserin, welche unseren Ergebnissen mit Nicotin im wesentlichen entsprechen, den Schluß, daß Eserin „irgendwo stromaufwärts im Reflexbogen", wahrscheinlich an den Interneuronen, angreift. Sie führen zur Erklärung der gegensinnigen Reaktion von PSR und ER die Theorie der reziproken Hemmung von Gasser an, mit deren Hilfe die Eserinwirkung erklärt werden könnte, ohne selektive Effekte auf bestimmte Interneuronengruppen anzunehmen.

Wir möchten ähnliche Gesichtspunkte für die Wirkung von Nicotin geltend machen und annehmen, daß Nicotin die Interneuronen des RM erregt (vgl. Bonnet u. Bremer). Die Verbesserung von FlR und ER wäre dann ohne weiteres verständlich. Die Lähmung des PSR durch unsere kleinen Nicotinmengen könnte auf der gleichen Basis so erklärt werden, daß es zur Erregung von Interneuronen kommt, welche eine hemmende Wirkung auf den PSR entfalten (vgl. Hughes u. Gasser, 1934 sowie Hughes u. Mitarb., 1937). Für diese Auffassung spricht unsere

Beobachtung, daß Nicotin die Lähmung der Interneuronen durch Parpanit und MY 301 antagonistisch beeinflußt, sowie der Befund, daß Interneuronengifte die Nicotinlähmung des PSR verhindern bzw. reduzieren können. Schon die Tatsache, daß dieselben kleinen Nicotindosen, welche den PSR verschlechtern, zu einer Verbesserung der multisynaptischen Reflexe führen, weist nach unserer Meinung auf eine gewisse Ähnlichkeit beider Reaktionen hin. Die hier vorgeschlagene Deutung würde auch erklären, warum der einfachere PSR — im Gegensatz zu den multisynaptischen Reflexen — durch derart geringe Nicotindosen gelähmt wird.

Werner, Ginzel und Klupp konnten die Nicotinlähmung des PSR mit Hilfe von Myanesin nicht unterdrücken. Auch in unseren Versuchen am PSR wurde die Wirkung von Nicotinmengen zwischen 100 und 250 γ/kg durch Parpanit und MY 301 nur abgeschwächt. Es hat den Anschein, daß bei höherer Dosierung eine direkte Lähmung des Reflexbogens durch Nicotin beteiligt ist oder gar überwiegt[1].

Die Wirkung von Nicotin auf den Flexoren- und Extensorentonus wurde durch Interneuronengifte nicht deutlich verändert. Es könnte sein, daß diese Nicotinwirkung sich an den Motoneuronen abspielt.

Zusammenfassung.

Schwellendosen von 50—250 γ/kg Nicotin führen bei decerebrierten Katzen zu einer Verbesserung von homolateralem Beuge- und kontralateralem Streckreflex. Der Patellarsehnenreflex wird durch die nämlichen Nicotindosen abgeschwächt bzw. unterdrückt.

Ein Antagonismus zwischen Nicotin und Interneuronengiften wurde sowohl an Flexor- und Extensor-, als auch am Patellarsehnenreflex nachgewiesen.

Zur Deutung dieser Befunde wird angenommen, daß Schwellendosen von Nicotin am Rückenmark vor allem zu einer Erregung von Interneuronen führen. Die Lähmung des Patellarsehnenreflexes wäre demnach u. a. durch Erregung von übergeordneten Interneuronen, welche eine hemmende Wirkung auf diesen Reflex entfalten, zu erklären.

Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz sind wir für die Förderung der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

---

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:* Nach Drucklegung unserer Arbeit erschien die ausführliche Publikation von K. H. Ginzel, H. Klupp, H. Stormann u. G. Werner, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 308 (1953). Es scheint danach, daß an der Lähmung des PSR durch Nicotindosen über 50 γ/kg eine Unterbrechung des Impulsablaufs im Bereich des "small motor nerve"-Systems beteiligt sein kann.

Literatur.

Berger, F. M.: Spinal cord depressant drugs. Pharmacol. Rev. **1**, 243 (1950). — Bonnet, V., and F. Bremer: Study of the after-discharge of spinal reflexes of the frog and toad. J. of Physiol. **90**, 45P (1937). — Bülbring, E., and J. E. Burn: Observations bearing on synaptic transmission by Acetylcholine in the spinal cord. J. of Physiol. **100**, 337 (1941/42). — Creed, R. S., D. Denny-Brown, J. C. Eccles, E. G. T. Liddell and C. S. Sherrington: Reflex activity of the spinal cord. Oxford: Clarendon Press 1932. — Dixon, W. E.: Nicotin, Coniin, Piperidin. Lupetidin, Cytisin, Lobelin, Spartein, Gelsemin. Mittel, welche auf bestimmte Nervenzellen wirken. Heffters Handb. der exper. Pharmakol., Bd. II, **2**, 656 (1924). — Eichholtz, F.: Zur Pharmakologie des autonomen Nervensystems. Arch. Ohr- usw. Heilk. u. Z. Hals- usw. Heilk. **163**, 98 (1953). — Eichholtz, F., H. Stephany u. N. Schmitt: Synergismus und Antagonismus bei der Kombination von Kohlensäure und Weckmitteln. Dissertation, Heidelberg (1944/45). — Eichholtz, F., u. D. Lüders: Dissertation, Heidelberg 1953 — Forst, A. W.: Zur Wirkung von gereinigtem Nicotin und von Cholin auf den Kreislauf. Arch exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 261 (1943). — Gasser, H. S.: The control of excitation in the nervous system. Harv. Lect. **32**, 169 (1937). — Gold, H., and W. Modell: Studies on the respiratory action of drugs by means of phrenic potentials. I. Nicotine. J. of Pharmacol. **57**, 310 (1936). — Gycha, F. P.: „MY 301", ein neues Muskelrelaxans. Med. Mschr. **6**, 166 (1952). — Harreveld, A. van, and G. A. Feigen: Effect of Nicotine on spinal synaptic conduction and on polarisation of spinal cord. J. of Neur. **11**, 141 (1948). — Hughes, J., and H. S. Gasser: The response of the spinal cord to two afferent volleys. Amer. J. Physiol. **108**, 307 (1934). — Hughes, J., G. P. Mc Couch and W. B. Stewart: Cord potentials in the spinal cat. Amer. J. Physiol. **118**, 411 (1937). — Koll, W.: Studien über den Antagonismus von Narcotika und Analeptika am Zentralnervensystem. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 365 (1937). — Krocker: Über die Wirkung des Nicotins auf den tierischen Organismus. Dissertation, Berlin 1868 (zit. nach Schweitzer u. Wright). — Langley, J. N., and W. L. Dickinson: Pituri and Nicotine. J. of Physiol. **11**, 265 (1890). — Libet, B., and R. W. Gerard: Automaticity of central neurones after Nicotine block of synapses. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **38**, 886 (1938). — Mc Dowall, R. J. S.: The effect of Carbon Dioxide on certain reflex activities. J. of Physiol. **69**, 9P (1930). — Merlis, J. K., and H. Lawson: The effect of Eserine on spinal reflexes in the dog. J. of Neur. **2**, 566 (1939). — Praag, von: Virchows Arch. **8**, 56 (1855) (zit. nach Schweitzer u. Wright). — Schweitzer, A., and S. Wright: Action of Nicotine on the spinal cord. J. of Physiol. **94**, 136 (1938). — Thomas, J. E., and F. E. Franke: The site of the toxic action of Nicotine on the respiratory mechanism. J. of Pharmacol. **34**, 111 (1928). — Truhart: Ein Beitrag zur Nicotinwirkung. Dissertation, Dorpat 1869 (zit. nach Schweitzer u. Wright). — Werner, G., K. H. Ginzel u. H. Klupp: Zur Wirkung des Nicotins auf das Rückenmark. Verh. der Dtsch. Pharmakol. Ges. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 148 (1953). — Wiersma, C. A. G., and W. Schallek: Potentials from motor roots of the crustacean central nervous system. J. of Neur. **10**, 323 (1947). — Wikler, A., and K. Frank: Hindlimb reflexes of chronic spinal dogs during cycles of addiction to Morphine and Methadon. J. of Pharmacol. **94**, 382 (1948).

Dr. R. Taugner, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 433—436 (1953).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. G. Schubert).

Hexachlorcyclohexan-Wirkung auf das Elektroretinogramm des Frosches.

Von
H. Kolder.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. Juli 1953.)

Die insektizide Substanz γ-Hexachlorcyclohexan (HCC) steigert beim Warmblüter die zentrale Erregbarkeit (Hoffmann u. Lendle u. a.), während andererseits alle vier bisher untersuchten Isomeren (α, β, γ, δ) durch Cardiazol bzw. Pikrotoxin hervorgerufene Krämpfe verhindern können (Herken u. Mitarb.). Diese Wirkung des HCC ist an einen intakten supratentoriellen Abschnitt des Gehirns gebunden; HCC hemmt dabei anscheinend die Koordination der Ganglienzelltätigkeit (Fritsch u. Krupp). Da die Retina entwicklungsgeschichtlich dem ZNS nahesteht, könnte sie an einer Erregbarkeitssteigerung desselben teilnehmen. Tatsächlich hat F. Schwarz eine Überempfindlichkeit gegen Licht bei Fröschen nach γ-HCC-Vergiftung beobachtet. Es erscheint daher zweckmäßig, das ERG nach γ-HCC-Vergiftung zu untersuchen, um Hinweise auf den Angriffsort der Substanz zu erhalten.

Methodik.

Es wurden 40 Froschaugen (R. escul.) im April und Mai 1953 untersucht. γ-HCC[1] wurde in Dosen von 1 und 5 mg in wäßriger Suspension bzw. von 1 mg in öliger Lösung injiziert. Das ERG wurde 24—72 Std nach der Injektion vom isolierten, teils intakten, teils eröffneten Bulbus abgeleitet. Die Tiere waren vorher mindestens 90 min dunkeladaptiert; die Präparation erfolgte bei Rotlicht. Als Lichtreiz diente ein 3,2 cm² großes Leuchtfeld in einem Abstand von 12 cm mit einer Leuchtdichte von 130000 asb. Reizdauer 1,5 sec. Abgeleitet wurde mit Ringer-getränkten Wollfadenelektroden, registriert mit R-C-Verstärker und Kathodenstrahloszillograph.

Ergebnisse.

Unter der Einwirkung von γ-HCC zerfällt die b- (und auch d-) Welle des Frosch-ERG in mehrere Teilkomponenten. Das ERG nach dem 1. Lichtreiz zeigt — wenn das Auge bei Rotlicht präpariert wurde —

[1] Für die Überlassung der notwendigen Menge γ-HCC („LINDANE" — 99% γ-Komponente) sind wir der Fa. „Epro", Wien, zu Dank verpflichtet.

entweder einen glatten Verlauf (Abb. 1, G) und erst nach einigen Lichtreizen Teilkomponenten, die an Amplitude bis etwa zum 20. Lichtreiz (Abb. 1, I) zunehmen, um dann gleich groß zu bleiben; oder die Teilkomponenten sind schon beim 1. Lichtreiz angedeutet (Abb. 1, D), um

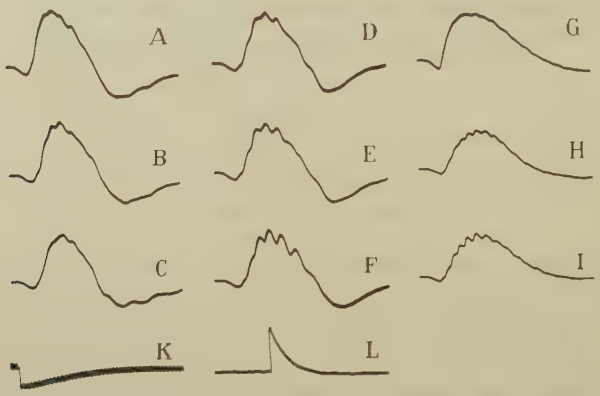


Abb. 1. ERG: *A—C* Normalfrosch (1., 10., 20. Lichtreiz); *D—F* vor 24 Std Injektion von 1 mg γ-HCC in wäßriger Suspension; *G—I* vor 48 Std 1 mg γ-HCC wie vorher; *K* Reizmarkierung und Zeit ($^1/_{50}$ sec); *L* Eichung: 200 mV (näheres siehe Text).

dann — wie vorher beschrieben — bis zum 20. Lichtreiz (Abb. 1, F) an Höhe zuzunehmen. (Die Pausen zwischen den einzelnen Lichtreizen betrugen 2 sec.) Die Frequenz der Teilkomponenten schwankt zwischen 15 und 25 Hz, wobei sich eine inverse Relation zwischen Amplitudenhöhe und Frequenz ergibt; die Amplitudenhöhe betrug bis zu 75 mV. Wird der Froschbulbus neuerlich für 5 min dunkeladaptiert, so ist im

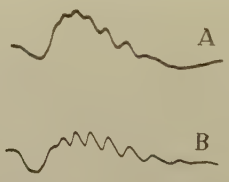


Abb. 2. ERG: Vor 48 Std Injektion von 5 mg γ-HCC in wäßriger Suspension; *A* Bulbus intakt, 20. Lichtreiz; *B* derselbe Bulbus eröffnet, 20. Lichtreiz nach neuerlicher Dunkeladaptation.

ERG nach dem 1. Lichtreiz keine oder eine nur sehr undeutliche Aufgliederung erkennbar; doch erreichen in diesem Fall die Teilkomponenten etwas rascher (bereits nach 15 Lichtreizen) ihre maximale Höhe. Werden in Abständen von 30 sec Lichtreize gesetzt, dann bleiben die Teilkomponenten bis zum Verschwinden des ERG erhalten. Ob das ERG vom intakten oder eröffneten Bulbus abgeleitet wird, hat keinen Einfluß auf

die Teilkomponenten (Abb. 2, A u. B). Das Maximum der Teilkomponentenausbildung im ERG war 72 Std nach der HCC-Injektion bereits überschritten. Auch beim unbehandelten Frosch (Abb. 1, A—C) kann manchmal eine Teilkomponentenbildung in der b- und d-Welle des ERG beobachtet werden (Müller), wenn in analoger Weise wie beim HCC-Tier abgeleitet wird, doch ergibt sich hier keine Zunahme der Amplituden parallel mit der Abnahme der Dunkeladaptation, auch wird zuweilen bei hoher Reizintensität die Aufgliederung nur nach jedem 2. Lichtreiz beobachtet. Die Teilkomponenten in der b-Welle bei den HCC-Tieren bleiben auch bei schwachen Lichtreizen (bis 1% der angegebenen Leuchtdichte) und bei Reizung mit farbigem Licht (rot, grün, gelb und blau) erhalten.

Diskussion.

Das retinale Potential P II (Granit) muß der Aktivität der vor den Ganglienzellen liegenden Retinastrukturen zugeschrieben werden, also der Erregung entweder der bipolaren Zellen allein oder noch zusätzlich der Erregung der Receptoren (Tomita u. Funaishi). Da es sich dabei um die Erregung vieler funktioneller Einheiten in einem größeren Neuronenlager handelt, ist der im allgemeinen glatte Verlauf der b-Welle nur durch weitgehende Synchronisation erklärlich. Diese Synchronisation kann schon unter normalen Bedingungen unvollständig sein, wie sich im ERG von Kaninchen, Katze, Ratte und Frosch (Granit, Müller) zeigt, wobei die Frage noch ungelöst ist, ob diese Aufgliederung durch negative Wellen im P II (nach der Einteilung von Granit) oder positive Wellen im P III verursacht wird. Da aber die Gesamthöhe der b-Welle nicht zugenommen hat, liegt der Schluß nahe, daß es zu einer gruppierten Entladung der dem P III (allgemein als Hemmungsvorgänge aufgefaßt) zugrunde liegenden elektrischen Vorgänge kommt. Da das HCC ein Auftreten von Teilkomponenten begünstigt, wäre seine Wirkung gegen eine Synchronisation in den vor den Ganglienzellen liegenden Neuralstrukturen (bipolare Zellen, amakrine Zellen, Horizontalzellen) gerichtet. Zweck einer weiteren Untersuchung wird sein, die Wirkung von γ-HCC auf die durch Pharmaka zu isolierenden retinalen elektrischen Teilprozesse zu erfassen. Ob die Wirkung, die HCC im ERG erkennen läßt, dahingehend zu verallgemeinern ist, daß der Angriffspunkt der Substanz in Schalt- bzw. Zwischenneuronenlagern liegt, muß noch offen bleiben.

Zusammenfassung.

Es wird über elektroretinographische Untersuchungen an Fröschen (R. escul.), die mit γ-Hexachlorcyclohexan vergiftet worden waren, berichtet. Es ergibt sich, daß HCC einen Zerfall der b-Welle in mehrere

Teilkomponenten verursacht oder verstärkt. Es werden intraretinale Synchronisierungsvorgänge durch γ-HCC gestört, und zwar in den vor den Ganglienzellen liegenden Neuralstrukturen.

Literatur.

Fritsch, H., u. H. Krupp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 227 (1952). — Granit, R.: Sensory Mechanisms of the Retina. Oxford: Univ. Press 1947. — Herken, H., H. Kewitz u. I. Klempau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 217 (1952). — Hoffmann, J., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 223 (1948). — Müller-Limroth, H. W.: Z. Biol. **105**, 393 (1953). — Schwarz, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 358 (1952); **217**, 194 (1953). — Tomita, T., and A. Funaishi: J. Neurophysiol. **15**, 75 (1952).

Dr. H. Kolder, Physiologisches Institut, Wien IX., Schwarzspanierstraße 17.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 437—442 (1953).

Aus der Universitäts-Hautklinik Mainz (Direktor: Prof. Dr. E. Keining).

Zur Messung der Blutfülle in der lebenden menschlichen Haut.

Von

R. Brett und H. Theismann.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Juni 1953.)

Die Farbe der Haut beim weißrassigen Menschen kann mancherlei Einflüssen unterliegen. Bei Belichtung der Haut mit UV tritt in verschiedenem Grade Bräunung ein, bei Lebererkrankungen kann es zur Einlagerung von Gallenfarbstoffen kommen. Mit der Nahrung zugeführte Farbstoffe, wie die Carotine, können in der Haut gespeichert werden. Üblicherweise jedoch weist die Haut der bekleideten Körperpartien eine im wesentlichen vom Blut bestimmte rote Farbe auf. Die blutleere Haut ist annähernd farblos.

Im Widerspruch zu dieser Feststellung stehen Untersuchungen von Tronier und Wagener. Bei der Untersuchung der spektralen Durchlässigkeit von 80 μ dicken oberflächenparallelen Hautschnitten fanden sie mit zunehmender Tiefe ausgeprägter werdende Durchlässigkeitsminima bei 500 und 640 nm, die die Autoren als spezielle Eigenart der (blutleeren) Haut werten. Haut mit geringer Hämoglobinbeimengung muß den gleichen spektralen Absorptionsverlauf zeigen, da die Hämoglobine bei denselben Farben Durchlässigkeitscharakteristica aufweisen. Man kann annehmen, daß es Tronier und Wagener nicht gelungen ist, nach der operativen Hautentnahme das gesamte Hämoglobin aus dem Hautstück zu entfernen.

Die Hautrötung beibt nicht konstant. Verschiedenste Gründe können sie verändern. Physiologischerweise ändert sich die Durchblutung gemäß den Erfordernissen des Wärmehaushaltes. Beim Erythema e pudore sind psychische Vorgänge für eine kurzfristige Durchblutungssteigerung maßgeblich. Jeder Entzündungsvorgang der Haut geht mit einer Hyperämie einher.

Ein besonderes Merkmal der modernen naturwissenschaftlich ausgerichteten Medizin ist die zunehmende Ausgestaltung der Meßtechnik. Im Zuge dieser Entwicklung sind eine Reihe von Untersuchungen zur quantitativen Erfassung der Hautrötung angestellt worden.

Es ist das Verdienst von Bode, einen exakten und praktisch anwendbaren Weg dazu gewiesen zu haben: die direkte Messung der spektralen Lichtremission. Ein Pulfrich-Photometer wird in unmittelbaren Konnex mit der lebenden Haut gebracht und zur Bestimmung der Remission nahezu monochromatisches Licht verwandt. Auf diese Weise

hat Bode erstmalig das spektrale Rimessionsvermögen für das sichtbare Licht festgelegt und kurvenmäßig dargestellt. Besonders auffällig sind dabei Remissionsmaxima bei 500 und 630 nm und eine erhebliche Remissionsminderung zwischen diesen beiden Maxima. Die Remissionsminderung ordnete Bode bereits der hohen Absorption des Hämoglobins in diesem Spektralbereich zu. Er fand weiter, daß bei Erythemzunahme das Rotmaximum praktisch konstant blieb, das Blaumaximum jedoch absank.

Mit Hilfe der beiden Remissionsmaxima bei 500 und 631 nm, die er mit R 1 und R 2 bezeichnete, hat Bode eine zahlenmäßige Formulierung für die Hautrötung angegeben: Rötung = R2/R1. Auf diese Art erhaltene Rötungswerte lassen sich jedoch nicht miteinander in Beziehung setzen. Wenn sich beispielsweise zwei Rötungswerte durch den Faktor 2 unterscheiden, so wird damit weder ausgesagt, daß die Remission noch die Blutmenge in dem einen Fall doppelt so groß ist wie in dem anderen. Alle quantitativen Definitionen sind fehlerhaft, die den exponentiellen Zusammenhang zwischen Lichtschwächung und Konzentration bzw. Schichtdicke außer acht lassen.

Wir sind unter Berücksichtigung des Absorptionsgesetzes von einer anderen Betrachtungsweise ausgegangen, um die Hautrötung und den ihr zugrunde liegenden Durchblutungszustand quantitativ zu erfassen. Zunächst war die Erkenntnis wichtig, daß nicht nur der Spektralbereich zwischen den Remissionsmaxima bei 500 und 630 nm durch die Absorptionsverhältnisse des Hämoglobins geformt wird, sondern daß das gesamte Remissionsspektrum von 470—650 nm identisch mit der Durchlässigkeitskurve einer Hämoglobinlösung ist.

Schichtdicken- und Konzentrationsänderungen bewirken Absorptionsänderungen, und damit bei der üblichen Aufzeichnung der spektralen Absorptionskurve in einem Koordinatensystem Verschiebungen dieser in vertikaler Richtung. Die Abszissenwerte der Maxima und Minima bleiben jedoch immer konstant. Durch die Erfassung der spektralen Durchlässigkeitskurve ist die Farbe der Hämoglobinlösung eindeutig festgelegt.

Bei photometrischen Untersuchungen zur Konzentrationsbestimmung von Hämoglobin wird man eine Lichtfarbe wählen, die besonders stark absorbiert wird, weil dadurch die Empfindlichkeit der Methode gesteigert wird. Wird z. B. bei einer zu messenden Lösung rotes Licht auf 90% und blaues Licht auf 20% geschwächt, dann würde die Durchlässigkeit bei Verdoppelung der Konzentration oder der Schichtdicke für rotes Licht 81% und für blaues Licht 4% betragen. Die relative Schwächung ist also im stärker absorbierten Spektralbereich größer, und geringe Konzentrationsänderungen haben deutlichere Ausschläge in der Durchlässigkeitsänderung zur Folge.

Ebenso wie die Blauabsorption bei Konzentrationssteigerung einer Hämoglobinlösung größer wird, sinkt die Blauremission bei Zunahme der Hautdurchblutung. Die Rotremission ändert sich unter denselben Voraussetzungen praktisch nicht, sie liegt zumeist zwischen 50 und 60%. Ein ähnliches Verhalten sehen wir bei Hb-Konzentrationen bzw. Schichtdicken, die 90—100% durchlassen. Verdoppelung der Hb-Menge bewirkt nur eine minimale Durchlässigkeitsminderung. Daraus können wir schließen, daß in der lebenden Haut Hb-Konzentrationen und Schichtdicken von rotem Licht durchstrahlt werden, die eine Durchlässigkeit von 90—100% zulassen. Das Remissionsdefizit gegenüber unserem Remissionsstandard (Barytweiß-Platte) zeigt, daß die streuenden Partikel der Haut größer sind oder nicht so dicht liegen wie in dem Streustandard. Die Konstanz des Rotremissionswertes bei Durchblutungsänderungen zeigt weiter, daß die Streuung größtenteils an den Hautstrukturen erfolgt und nur unwesentlich an den Erythrocyten.

Im vorangehenden haben wir ganz allgemein die spektralen Durchlässigkeitsverhältnisse von Hb-Lösungen erörtert. In den vom Licht betroffenen Gefäßen der Haut kommen üblicherweise 2 Hämoglobine vor, das reduzierte und das oxydierte Hämoglobin. In großen Zügen weisen beide zwar ähnliche Absorptionsverläufe auf. Bei exakten Messungen würden die Differenzen zwischen beiden im allgemeinen aber doch so groß sein, daß man nicht umhin kommt, die jeweilige Natur des Hämoglobins zu berücksichtigen. Allein durch Änderung des Mengenverhältnisses können Durchlässigkeits- bzw. Remissionsunterschiede bewirkt werden. Ausgenommen ist eine Lichtfarbe, die von beiden Hämoglobinen in gleichem Maße absorbiert wird, und das ist für Licht mit der Wellenlänge von 500 nm der Fall. Aus diesem Grunde führten wir unsere Lichtremissionsmessungen zur Bestimmung der Erythemstärke bei 500 nm durch. Der erhaltene Remissionswert gibt in eindeutiger Weise Auskunft über den Farbzustand der Haut in diesem Spektralbereich. Der Remissionswert sagt aber nichts aus über die Hämoglobinkonzentration bzw. Schichtdicke, der er zugeordnet ist. Durchblutungsreaktionen der Haut lassen sich mit Hilfe ihrer Remissionswerte quantitativ nicht vergleichen: bei 2 Remissionswerten, die sich durch den Faktor 2 unterscheiden, liegt kein gleiches Hämoglobinkonzentrationsverhältnis zugrunde. Mit Hilfe einiger Rechnungsgänge gelingt es aber, eine Formulierung zu finden, die es gestattet, *die verschiedenen Rötungsabläufen zugrunde liegenden Durchblutungsreaktionen quantitativ in Beziehung zu setzen.*

Veränderungen des Blutgefäßkalibers und der Zahl der blutgefüllten Gefäße ändern die Konzentration des Blutes in der Haut. Nach dem Absorptionsgesetz [genaue Formulierung s. Heilmeyer (1)] ist der negative Logarithmus des Verhältnisses der Eingangs- zur Ausgangslicht-

menge proportional der Konzentration der absorbierenden Substanz in der absorbierenden Schicht. Falls wir daher, statt wie bisher in unseren Arbeiten über die Hautdurchblutung die relative prozentuale Remission auf die Ordinaten aufzutragen, deren negative Logarithmen verwenden, so erhalten wir ein relatives Maß für die Blutmenge während eines Erythemablaufs. Wenn also z. B. der Inhalt der Fläche, die begrenzt wird von der Abszisse durch die Ausgangsordinate und der Verbindungslinie der folgenden bei Durchblutungsänderungen gemessenen Ordinaten, doppelt so groß ist wie eine entsprechend zustande gekommene andere Fläche, so können wir aussagen, daß im ersten Fall die Zunahme der Blutmenge in der Haut doppelt so groß ist wie im zweiten Falle. Ein

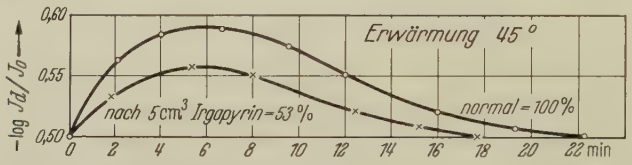


Abb. 1. Herabsetzung der Durchblutungsgröße eines Wärmeerythems von 45° durch Irgapyrin. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: neg. log I_d/I_o.

absolutes Maß für die Blutmenge der Haut wird sich nicht finden lassen, da deren Bestimmung entweder die Absolutbestimmung der Schichtdicke oder der Konzentration voraussetzt.

Bei der Analyse auf andere Farbsubstanzen in der Haut wird entsprechend der Blutbestimmung vorgegangen. Melanin weist für sichtbares Licht keine typische Absorptionsbande auf: die Absorption steigt kontinuierlich vom roten zum blauen Spektralbereich [Heilmeyer (2)]. Eigene Messungen an hyperpigmentierter lebender Haut hatten dasselbe Ergebnis. Falls mit einer Pigmentzunahme eine Zunahme der Blutfülle einhergeht (z. B. beim UV-Erythem), muß die Hautremission nach künstlicher Anämisierung gemessen werden. Bei unseren Untersuchungen hat sich die Anämie nach Adrenalin-Iontophorese am besten bewährt. Die Druckanämisierung läßt sich einfacher durchführen. Bei ihr lassen sich aber in geringem Maße noch die typischen Hämoglobin-Absorptionsbanden nachweisen.

Zur experimentellen Methodik.

In der letzten Zeit haben wir unter Verwendung des Bodeschen Meßprinzips und unter Anlehnung an den Bodeschen Aufbau eine Apparatur zusammengestellt, die als Bauteile, die unmittelbar zum Meßvorgang benötigt werden, nur das Pulfrich-*Photometer* mit Zubehör verwendet. Die Apparatur ist absichtlich so einfach wie möglich gehalten, ohne jedoch an Exaktheit der Meßergebnisse einzubüßen. Sie soll vor-

nehmlich der routinemäßigen Durchführung der Blutmengenbestimmung in der Haut dienen.

Die von Bode verwendete Lichtquelle (Lichtbogen zwischen 2 Wolframkugeln) erwies sich als nicht aurseichend. Unvermeidliche Veränderungen der Ansatzpunkte des Lichtbogens auf den Wolframkugeln führen zu Schwankungen der Helligkeitsverteilung des Meßlichtes und damit zu einer verschiedenen Ausleuchtung von Meßfeld und Streustandard. Exakte, reproduzierbare Messungen sind so nur bedingt möglich. Ein in den Lichtgang geschaltetes Spiegelraster (Theismann) bewirkt zwar eine Besserung, genügte aber noch nicht den formulierten Ansprüchen. Wir verwenden jetzt eine Glühfadenlampe (30 W, 5 A), deren unzureichende Lichtemission für Remissionsmessungen wir in unserer Anordnung durch Erhöhung der

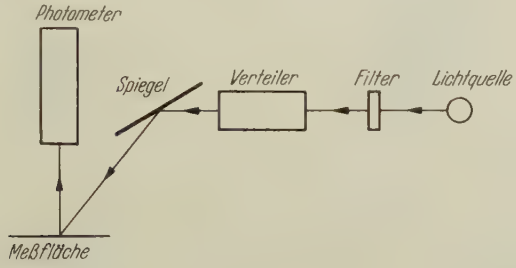


Abb. 2. Schema der Meßanordnung.

Leistungsaufnahme (42 W, 6 A) auf die für uns erforderliche Stärke gebracht haben. Es ist notwendig, konstante Stromverhältnisse einzuhalten, da das Emissionsspektrum des Glühfadens von dem Ausmaß seiner Erwärmung und damit von der Aufnahme der elektrischen Leistung abhängig ist. Am Pulfrich-Photometer wurden im Bereich der beiden Eintrittsfenster einseitig aufgeschnittene Metallrohre angebracht. Sie dienen der Abstandsfixierung zwischen Photometer einerseits und Haut- und Streustandard andererseits. Der mechanische Aufbau wurde so getroffen, daß sich die Achse der Metallrohre nicht mit dem dem Einfallswinkel des Meßlichtes zugeordneten Ausfallswinkel deckt. Diese Anordnung ist notwendig, um das an der wechselnd glänzenden Hautoberfläche reflektierte Licht von der Messung fernzuhalten. Gemessen wird nur das in der Haut gestreute Licht. Aus diesem Grunde haben wir auch die Bodesche Formulierung der „Reflexion" verworfen und sprechen statt dessen von „Remission". Die Spektralzerlegung erfolgt mit Hilfe des zum Pulfrich-Photometer gehörigen Filters S 50. Das Lambert-Beersche Gesetz hat Gültigkeit für absolut monochromatisches Licht und weiter, wenn die Durchlässigkeitsverteilung von Filter und Meßlösung identisch sind. Diese Bedingung ist für das Filter S 50 und das Blauremissionsmaximum erfüllt.

Schon ein geringer Druck auf die Haut bewirkt eine Anämisierung. Da der Abstand zwischen Photometer und Meßfläche sehr schwierig konstant und reproduzierbar herzustellen ist, wird es notwendig, die Haut bei der Messung nur in ganz leichte Berührung mit dem abstandsfixierenden Metallrohr zu bringen. Als Meßobjekt wählten wir darum zumeist den Arm und hier die ellbogennahe haarlose Haut der Unterarmbeugeseite. Der Arm wird in ein größenentsprechendes Bett gelegt. Das Armbett kann mit Hilfe eines Schraubtriebes mit geringer Steigung in einer den obigen Erfordernissen genügenden Weise mit dem Metallrohr in Berührung gebracht werden. Die aufgeführten optischen und mechanischen Voraussetzungen ermöglichen die große Präzision unserer Meßmethode.

Es sind zur Erreichung der von uns gefundenen optimalen Reproduzierbarkeit mit einer Fehlerbreite von $\pm$ 2% noch einige Vorbereitungen mit der Versuchsperson zu treffen. Der unbekleidete Testarm, der im Meßraum oder in einem ebenso temperierten Raum sitzenden Versuchsperson wird bei konstanter Raumtemperatur senkrecht zur Körperachse gelagert. Bei Untersuchungen, die mehrere Tage in Anspruch nehmen, soll die Messung zur gleichen Tageszeit erfolgen.

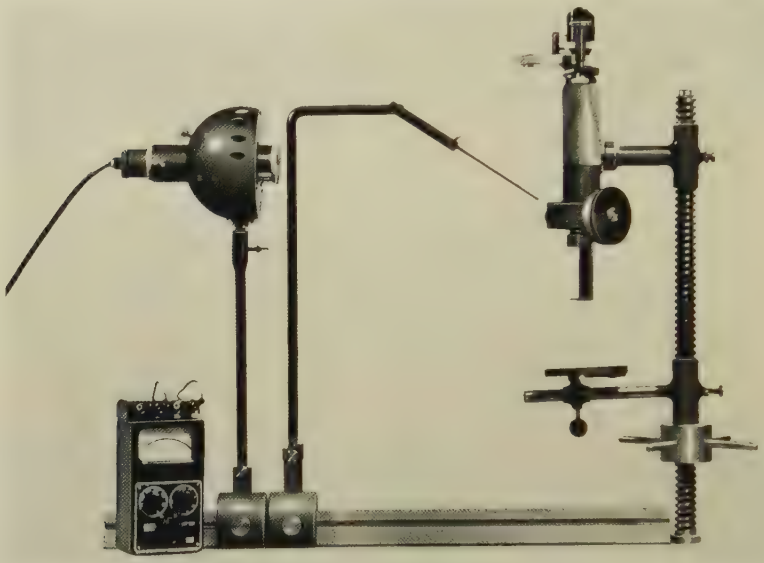


Abb. 3. Photographische Aufnahme des Erythemmeßgerätes in der Anordnung nach Brett-Theismann.

Zusammenfassung.

Es wird eine neue Methode beschrieben, die es gestattet, Farbänderungen der lebenden menschlichen Haut quantitativ zu erfassen. Besonders wird auf die Messung der Hautrötung eingegangen. Zwischen Hautrötung und Blutmenge in der Haut wird ein rechnerischer Zusammenhang aufgestellt. Abschließend wird eine einfache Erythemmeßapparatur beschrieben, die eine Reproduzierbarkeit von $\pm$ 2% gestattet.

Literatur.

Tronier u. Wagener: Strahlenther. **85**, 478 (1951). — Bode: Strahlenther. **51**, 81 (1934). — Heilmeyer (1): Med. Spektrophotometrie. Jena 1933, S. 3ff. — Heilmeyer (2): Med. Spektrophotometrie, S. 249ff. Jena 1933. — Theismann: Strahlenther. **80**, 599 (1949).

Dr. R. Brett, Universitäts-Hautklinik, Mainz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 443—447 (1953).

Aus dem Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz (Chem. Abt.).

Weitere Untersuchungen über die retikulo-endotheliale Clearance für Makromoleküle.

(VI. Mitteilung.)

Über den Einfluß der Schilddrüsenfunktion.

Von

MAX FRIMMER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Juni 1953.)

Ein zur Messung der Aufnahmekapazität des R. E. S. für makromolekulare Fremdkörper entwickeltes Verfahren, bei dem die Eliminationshalbwertzeit (EHZ) einer intravenös injizierten Menge von mit ^{32}P markiertem Kalium-Natrium-Polyphosphat (PP) bestimmt wird[1,2] hat gezeigt, daß die Eliminationsgeschwindigkeit für diesen Stoff individuell verschieden, aber konstant ist. Es konnte nachgewiesen werden, daß die EHZ vom Funktionszustand des RES und von den Kreislaufverhältnissen, insbesondere der Leber abhängt. Es war zu erwarten, daß dieses komplizierte System auch endokrinen Regulationen untersteht. Als erstes endokrines System wurde die Schilddrüse gewählt, da diese experimentell leicht zugänglich und theoretisch nach dem Stand des Wissens relativ gut zu überblicken ist. Außerdem sind aus der Hämatologie eine hinreichende Menge von Beispielen bekannt, die auf einen Einfluß der Schilddrüse auf die RES-Funktion schließen lassen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Schilddrüse auf die RES-Clearance durch Exstirpation des Organs, durch Medikation von Methylthiouracil (MTU) und durch Injektion größerer Thyroxinmengen bei Normaltieren untersucht. Weiterhin wurde geprüft, inwieweit etwaige Clearanceänderungen durch Verabfolgung von Thyroxin bzw. Absetzen des MTU rückgängig zu machen sind.

Experimenteller Teil.

Die Versuche wurden an einem heterogenen Material von Hunden durchgeführt. Der Clearancetest wurde unter Einhaltung der in der zweiten Mitteilung[2] ausführlich geschilderten Kautelen durchgeführt. Die bei den einzelnen Tieren in Abständen von 2—8 Tagen gemessenen EHZ-Werte wurden wie bisher[3, 4] in Indexprozente umgerechnet, wobei der individuelle Normalwert des unbehandelten Tieres als 100 gesetzt wird. Werte über 100 bedeuten demnach eine Verlängerung der EHZ und damit eine Herabsetzung der Clearance, Werte unter 100 eine Steigerung derselben.

Bei einer Reihe von Hunden wurde die Schilddrüse in Pernoktonnarkose entfernt. Es gelang nur in drei Fällen, die Funktion der Nebenschilddrüsen zu erhalten. Beim Hund befinden sich bekanntlich die Nebenschilddrüsen in der Regel innerhalb der Schilddrüse. Bei den Tieren, die tetanische Symptome zeigten, war eine Verabfolgung von AT 10 wenig nutzbringend. Sie starben im Laufe von 4—10 Tagen nach der Operation. Bei allen ad Exitum gekommenen Tieren wurde die Clearance verfolgt. Sie war in allen Fällen erheblich und progredient vermindert. Für die vorliegende Fragestellung können diese Ergebnisse jedoch nicht verwertet werden. Einmal kann bei diesen Versuchen die Funktion von Schilddrüse und Nebenschilddrüse bezüglich der Auswirkung auf die RES-Clearance nicht unterschieden werden. Außerdem war schon früher mitgeteilt worden[2] daß eine EHZ-Verlängerung nach operativen Eingriffen, ja schon nach tiefen Narkosen regelmäßig beobachtet wird. Ob dieser Effekt kreislaufbedingt ist oder mit den Verhältnissen des postoperativen Proteinstoffwechsels zusammenhängt, kann mit der benutzten Methode nicht entschieden werden. Für die eingangs geschilderte Fragestellung lassen sich nur Tiere verwerten, welche die OP längere Zeit ohne tetanische Symptome überleben und deren OP-Wunde ohne Komplikation primär abheilt. Thyroxin wurde in den aus der Abbildung ersichtlichen Mengen intramuskulär zwei gesunden Versuchstieren injiziert. MTU wurde 5 Hunden mit dem Futter verabfolgt.

Die erforderlichen Versuchsmengen von Thyroxin wurden uns in freundlicher Weise von der Firma Hoffmann la Roche, Grenzach/Baden, von MTU von der Firma Dr. Herbrand, Hormonforschungslaboratorium Gengenbach/Baden, überlassen.

Ergebnisse.

In der Abb. 1 sind die Clearancewerte eines 15 kg schweren Hundes als Indexprozente gegen die Zeit aufgetragen. Der Normalwert betrug bei diesem Tier 8 min EHZ. Nach der operativen Entfernung der Schilddrüse kommt es zu einer erheblichen Verlängerung der EHZ, die auch nach Erholung des Tieres plateauförmig anhält. EHZ-Verlängerung nach anderen operativen Eingriffen erfolgt, wenn die Tiere nicht moribund sind, in wesentlich geringerem Umfang. Die Kurven zeigen dann immer einen deutlichen Gipfel. Bei dem in Abb. 1 dargestellten Versuch war zum Zeitpunkt der ersten Thyroxininjektion die OP-Wunde reizlos abgeheilt. Nach einigen weiteren Injektionen nimmt die EHZ wieder erheblich ab und nähert sich dem Normalwert, ohne ihn jedoch zu erreichen. Ein zweiter gleich angelegter Versuch zeigte das selbe Ergebnis. Ein dritter Versuch, bei dem die Thyroxinverabfolgung einige Tage länger

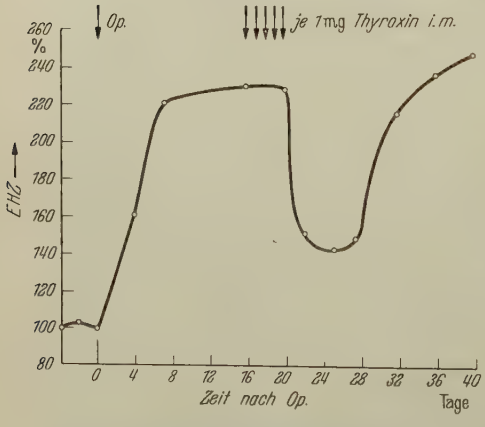


Abb. 1. Verhalten der RES-Clearance (EHZ-Indexprozente) nach Thyreoidektomie und nachfolgender Thyroxinbehandlung.

durchgeführt wurde, ergab, daß auch hierbei der Normalwert nicht wieder erreicht wurde. Bei allen Versuchen stieg die EHZ im Laufe weniger Tage nach Absetzen der Thyroxinmedikation wieder auf den Wert nach der OP oder sogar etwas darüber hinaus an.

Abb. 2 zeigt einen Versuch, bei dem die funktionelle Ausschaltung oder Dämpfung der Schilddrüse durch MTU-Verfütterung versucht wurde. Man sieht, daß bei der angegebenen Dosis (Gewicht des Hundes 11 kg) zwar zunächst eine Verlängerung der EHZ auftritt, daß diese aber quantitativ nicht das Ausmaß der EHZ-Verlängerung nach Exstirpation der Drüse erreicht. Diese war auch bei den übrigen 4 Versuchen mit MTU bei zum Teil höherer Dosierung und längerer Verabfolgung nicht zu erzielen. In allen Fällen begann noch unter der MTU-Medikation die EHZ-Kurve wieder abzusinken. Abb. 3 stellt einen Versuch mit höherer und länger dauernder MTU-Gabe dar. Auch hier konnte

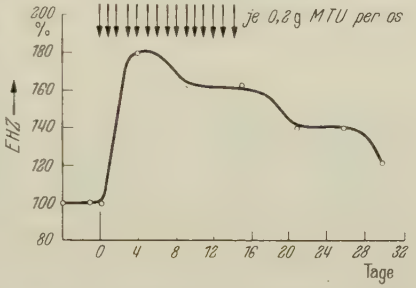


Abb. 2. Verhalten der RES-Clearance nach MTU-Verabfolgung.

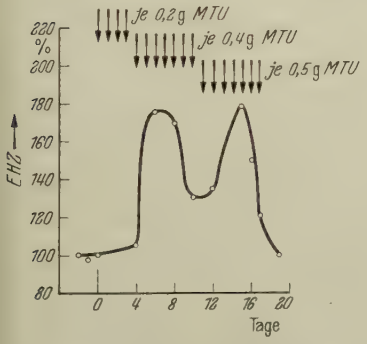


Abb. 3. Verhalten der RES-Clearance nach MTU-Verabfolgung.

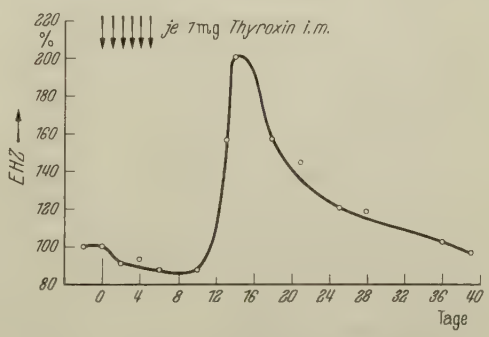


Abb. 4. Verhalten der RES-Clearance nach Thyroxininjektionen beim Normaltier.

ein Gipfelplateau der EHZ-Kurve nicht erzwungen werden. Ein vorübergehender Wiederanstieg nach dem ersten Abfall wurde noch in einem weiteren Versuch beobachtet. Reproduzierbar ist die initiale Verlängerung der EHZ unter MTU-Medikation und das Wiederabsinken unter der MTU-Behandlung. Ein Zusammenhang zwischen Kurvenverlauf und äußerem Verhalten der Tiere konnte nicht beobachtet werden. Abb. 4 zeigt das Verhalten eines gesunden, unvorbehandelten Hundes (Gewicht 18 kg) nach Thyroxininjektionen.

In einer initialen Phase werden die EHZ-Werte etwas unter die Norm verschoben. Diese wenn auch geringfügige Clearancezunahme liegt außerhalb der physiologischen Schwankung unbehandelter Tiere. Einige Tage nach Absetzen des Hormons beginnt eine gegenläufige Bewegung, die sich nur sehr langsam zur Norm zurückbewegt. Ein zweiter, gleich angelegter Versuch ergab den selben Befund.

Diskussion.

Die wenn auch geringe Anzahl der mitgeteilten Versuche läßt den Schluß zu, daß für die physiologische Funktion des Eliminationsvermögens des RES für makromolekulare Fremdkörper eine intakte Schilddrüse notwendig ist. Hingegen ist noch nicht gesichert, ob der Schilddrüse die Eigenschaft eines Reglers zuzuschreiben ist. Die Clearancezunahme nach Thyroxininjektionen ist zu geringfügig für die Behauptung, eine erhöhte Thyroxinkonzentration würde die Elimination beschleunigen, während Thyroxinmangel zu einer Verlangsamung derselben führe.

Der Grad der Clearanceabnahme nach Schilddrüsenexstirpation entspricht, übertragen auf die Erfahrungen früher mitgeteilter RES-Blockadeversuche bzw. Schädigung des RES durch cytostatische Stoffe, einer deutlichen Herabsetzung des Eliminationsvermögens für PP. Eine Deutung ist in zweierlei Richtung möglich. Die Verlängerung der EHZ nach Ausfall der Drüse könnte rein hämodynamisch bedingt sein. Da die RES-Clearance erheblich von der Durchblutung von Leber und Milz abhängt[2,5] ist es vorstellbar, daß durch die allgemeine Verlangsamung des Kreislaufs nach Ausfall der Schilddrüsenfunktion die Clearanceabnahme erklärt werden kann. Weiterhin ist daran zu denken, daß das Thyroxin einen direkten Angriffspunkt an den Zellen des RES hat, was bei dem ubiquitären Vorkommen des Hormons nicht verwunderlich wäre. Vielleicht genügt schon die Grundumsatzsenkung für die Störung der Eliminationsfähigkeit des RES. Die Tatsache, daß die Clearanceverminderung nach Verlust der Schilddrüse durch Thyroxin nicht voll kompensiert werden kann, läßt an einen zweiten Faktor denken. Dafür spricht auch, daß bei erhaltener Schilddrüse auch hohe MTU-Dosierung nicht den Effekt der Thyreoidektomie bewirkt. Der schon unter der Medikation wieder zunehmende Eliminationsvermögen des RES könnte als Gegenregulation durch den vorläufig hypothetischen zweiten Faktor aufgefaßt werden. Da die Clearanceausschläge unter MTU-Medikation auch quantitativ nicht denselben Grad erreichen, der nach Thyreoidektomie beobachtet wird, ist der alleinige Ausfall des Thyroxins nicht sicher für die Zunahme der Eliminationsgeschwindigkeit des RES verantwortlich zu machen. Auch der biphasische Verlauf der Clearance-

kurven nach Thyroxininjektionen könnte als eine Gegenregulation aufgefaßt werden. Wie zur Zeit in Gang befindliche Untersuchungen zeigen, bestehen ausgeprägte Beziehungen zwischen Nebennierenrinde und RES-Funktion. Es ist denkbar, daß durch diese Beziehungen auch die vorliegenden Schilddrüsenversuche einer weiteren Deutung zugeführt werden können.

Literatur.

[1] Frimmer, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 91 (1953). — [2] Frimmer, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 313 (1953). — [3] Frimmer, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 320 (1953). — [4] Frimmer, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. V. Mitt. **220**, 334 (1953). — [5] Frimmer, M., u. H. Götte: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 319 (1953).

Dr. Max Frimmer, Pharmakol. Institut d. Universität Münster/Westf., Westring 12.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 448—464 (1953).

Aus der Med. Univ.-Poliklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. H. J. Sarre).

Über die Pathogenese verschiedener Formen experimenteller Nephritis*.

Von
Klaus Rother.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. Juli 1953.)

Klinisch gleicht die experimentelle Nephritis nach Masugi völlig der des Menschen mit den Cardinalsymptomen Blutdrucksteigerung, Albuminurie und Hämaturie. Auch histologisch zeigen die Nieren ein Bild, das dem einer diffusen Glomerulonephritis (G.N.) des Menschen außerordentlich ähnelt. Masugi selbst weist jedoch in seiner Arbeit darauf hin, daß bei dieser „Serumnephritis" histologische Unterschiede gegenüber der beim Menschen bestehen. So vor allem scheint die Läsion bei der Serumnephritis zunächst die kleinen und kleinsten arteriellen Gefäße zu treffen, um erst dann auf den Glomerulus überzugreifen. Wegen der Gleichheit der klinischen und der großen Ähnlichkeit der histologischen Krankheitsbilder mit denen bei menschlicher G.N. ist dieser Modellversuch viel diskutiert und bearbeitet worden. Über den genauen allergischen Reaktionsmodus ist jedoch eine abschließende Urteilsbildung noch nicht erfolgt.

1947 gelang es Hawn und Janeway durch einmalige Injektion von gereinigten Rinder-Gamma-Globulinen bei Kaninchen ebenfalls eine G.N. auszulösen. Auch hier wurde nach Meinung der Autoren eine weitgehende klinische Übereinstimmung des erzielten Krankheitsbildes mit der der menschlichen G.N. festgestellt und histologisch der Befund einer Nephritis erhoben.

Angeregt durch die Arbeiten von H. Sarre soll im folgenden versucht werden, an Hand der Literatur und eigener Untersuchungen eine Deutung zu finden, die sowohl die Masugi- als auch die Rinder-Gamma-Globulin-Nephritis auf das gleiche Entstehungsprinzip zurückführt.

Als serologische Methode der quantitativen Erfassung und Bestimmung der im Blute kreisenden Antikörper wurde ein Verfahren benutzt, das im wesentlichen von Heidelberger und seiner Schule entwickelt worden ist.

* Die hier mitgeteilten serologischen Befunde wurden im Rahmen einer Gemeinschaftsarbeit unserer Klinik über experimentelle Nephritis gewonnen. Die histologischen Befunde sind einer Gesamtveröffentlichung der Arbeitsgruppe Moench, Rother, Sartorius vorgegriffen.

Serologische Methode.*

Prinzip: Eine vorher ermittelte optimale Menge des Antigen wird mit dem zu prüfenden Serum zusammengebracht. Das entstehende Präzipitat wird im Mikro-KJELDAHL-Verfahren auf Stickstoff untersucht. Die erhaltene Stickstoffmenge ist ein genaues Maß des präzipitierten Eiweißes. Die maximale Fehlerbreite liegt dabei bei $\pm 0{,}01$ mg N.

Dieses Verfahren bietet den Vorteil exakter Meßbarkeit der erhaltenen Mengen des Präzipitates gegenüber anderen Verfahren mit Verdünnungsreihen, die subjektiven Fehlern unterliegen und mit großen Ungenauigkeitsbreiten arbeiten. Zur Vermeidung eines Inhibitionseffektes, wie er ebenfalls bei älteren Verfahren auftreten kann, wurde vor den eigentlichen Versuchen für jedes Tier eine Testreihe angesetzt mit dem Ziel, die in einer bestimmten Serummenge enthaltenen Antikörper (A.K.) möglichst völlig zur Präzipitation zu bringen. Für diese Untersuchung wurde jeweils das Kaninchenserum des Todestages benutzt, das bei drohendem Exitus letalis durch Punktion der Vena cava inf. unter Äthernarkose gewonnen wurde. Mit der so bestimmten, für die Präzipitation optimalen Antigenmenge wurde dann im folgenden der eigentliche Versuch ausgeführt (siehe Abb. 1, Beispiel der Bestimmung eines Reaktionsoptimum).

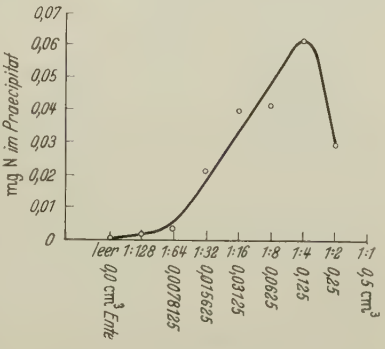


Abb. 1. Beispiel der Bestimmung eines Reaktionsoptimum. Es zeigt sich, daß mit steigender Menge des Antigen die Präzipitatmenge zunimmt, um bei Überschreiten eines Flockungsmaximum wieder steil abzusinken. Bestimmung des Reaktionsoptimum. Masugi-Kanin-Serum gegen Entenserum. Ordinate: *mg N* im Präzipitat; Abszisse: Ansteigende Menge des Entenserum bei gleicher Menge Masugi-Kanin-Serum.

Alle Präzipitationen wurden mit einer Verdünnung des Antigen auf 0,5 cm³ NaCl-Lösung durchgeführt. Von dem A.K. enthaltenden zu untersuchenden Kaninchen-Serum wurden ebenfalls 0,5 cm³ in 1:1 NaCl-Verdünnung angewandt. Wir sind im allgemeinen so vorgegangen, daß mit einer möglichst hohen Verdünnung des Antigen begonnen wurde. Die Antigenmenge wurde dann gesteigert, bis geringer werdende Trübung bzw. Ausflockung die Überschreitung des Maximum anzeigte. Die Bestimmung der Stickstoffwerte des Präzipitats sicherte das Ergebnis der visuellen Beobachtung.

Es zeigt sich, daß die optimale Ausfällung bei einer Antigenmenge von 0,125 cm³ Entenserum liegt, was einer Verdünnung von 1:4 entspricht. Bei fortschreitender Verdünnung fällt die Präzipitatmenge ab, ebenso ist bei Verwendung einer größeren Antigenmenge nur eine wesentlich geringere Präzipitatmenge zu erzielen. Diese Erscheinung ist durch den Effekt der „Inhibition" durch Antigenüberschuß zu erklären (HEIDELBERGER, 1929, GRABAR, 1943).

In unserem Fall wurde die Antikörperbestimmung also in dem ermittelten optimalen Verhältnis von 0,5 cm³ Kaninchenserum gegen 0,125 cm³ des Antigen

* Für die freundliche Unterstützung durch zahlreiche Anregungen und Hinweise möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. OTTO WESTPHAL, Säckingen, meinen herzlichen Dank sagen.

durchgeführt. Es ist offensichtlich, daß dieses Verfahren die Mängel der Titerbestimmung durch Verdünnungsreihen weitgehend ausschaltet. Die Möglichkeit, in eine Inhibitionszone zu gelangen, ist vermieden. Kritisch soll jedoch bemerkt werden, daß bei exakten Untersuchungen über Inhibitionszonen gelegentlich 2 oder 3 Optima der Präzipitation gefunden wurden. Da wir nur bis zur Festlegung eines ersten Maximum der Ausfällung untersuchten, ist es denkbar, daß bei weiterer Nachforschung weitere Maxima erreicht worden wären, bei denen ein noch vollständigerer Ausfall der Antikörper hätte erreicht werden können. Mehrfache Maxima sprechen für multiple Antigene, wie sie z. B. im nativen Entenserum und auch im Nierenbrei vorliegen. Die Möglichkeit einer geringfügigen Deformierung des Kurvenverlaufes ist also in Kauf genommen worden. Die auf Grund des Vorversuches bestimmte Antigenmenge bleibt konstant. Eine weitere Ungenauigkeitsquelle ist daher das durch die unterschiedliche A.K.-Menge der Seren der jeweiligen Entnahmetage veränderte Antigen-Antikörper-Verhältnis. Die Verschiebung dieses Verhältnisses ist jedoch in unserem Fall für eine Beeinflussung des Kurvenverlaufes im Sinne einer Inhibition nicht ausreichend.

Ausführung (modifiziert nach Heidelberger). 0,5 cm³ des klaren Serums werden auf 1,0 cm³ verdünnt und mit dem Antigen in weiten und dickwandigen Präzipitationsröhrchen zuasmmengebracht. Die Zugabe einer Spur von Borsäure kann zur Beschleunigung der Reaktion benutzt werden. Die Röhrchen werden 2 Std in ein Wasserbad von 37° C gesetzt. Anschließend 36—48 Std Eisschrank von etwa + 1° C. Danach werden die Röhrchen in einer Kühlzentrifuge bei + 1° C zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird vorsichtig abgegossen und etwa 2—4 cm³ eiskalte NaCl-Lösung aufgefüllt. Wieder für etwa ½ Std Eisschrank, nochmals zentrifugieren, abgießen. Die Zugabe von 3 cm³ destilliertem Wasser bringt das Präzipitat wieder in Lösung. Geht die Lösung schlecht oder unvollkommen vor sich, so wird ein Tropfen NaOH zugegeben. Anschließend N-Bestimmung nach Kjeldahl.

Herstellung des nephrotoxischen Entenserum.

Kaninchennieren werden sofort nach Tötung der Tiere entnommen und sorgfältig mittels Durchspülung mit NaCl-Lösung entblutet. Durch Zermahlen in der Gewebsmühle entsteht ein Brei, von dem 4 g pro Ente intraperitoneal gespritzt werden, insgesamt 30 Injektionen. Die Enten werden dann durch Dekapitation getötet und das Blut aufgefangen. Das Serum wird eine halbe Stunde durch Erhitzen auf 56° inaktiviert und im Eisschrank für die Versuche aufbewahrt. Im allgemeinen genügen 5 cm³ dieses nephrotoxischen Serum i. v., um bei den Versuchstieren, Kaninchen, eine G.N. auszulösen.

Herstellung des Nierenantigen.

Etwa 50 g Kaninchenniere werden sorgfältig mit Kochsalzlösung durchspült, bis keine Blutreste mehr aus der Vene austreten. Die Nieren werden dann zerkleinert und durch die Gewebsmühle gedreht. Es entsteht ein Brei, der über Nacht in Gegenwart von Chlor-Calcium in den Exsiccator gestellt und getrocknet wird. Die erhaltene Substanz wird mit Äther von Fetten und Lipoiden gereinigt und wieder getrocknet. Man zerreibt sie dann im Mörser, bis ein feines, gleichmäßig zerkleinertes Pulver entsteht. Dieses Pulver wird bei 1° C in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und für 12 Std in den Eisschrank gestellt. Nach Absedimentieren und Filtrieren des Rückstandes erhält man eine leicht gelblich gefärbte klare Lösung von Niereneiweiß. Da wir alle Versuche mit einer auf diese Weise einmal hergestellten Lösung durchgeführt haben, konnte auf eine Standardisierung verzichtet werden.

Ergebnisse.

I. Die Masugi-*Nephritis.*

a) Allgemeine Untersuchung.

Es wurden kurz vor der Injektion des nephrotoxischen Serum und danach alle 2—4 Tage etwa 5 cm³ Blut aus der Ohrvene des Kaninchens entnommen. Das Serum wurde gegen Normalentenserum präzipitiert, die erhaltenen Titer zeigt Abb. 2. Jeder Wert ist das Mittel aus 2 Bestimmungen, die in keinem Fall um mehr als 0,02 mg N differierten.

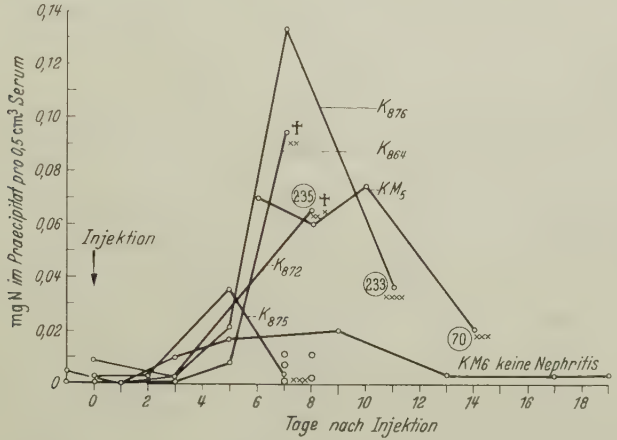


Abb. 2. Entwicklung der Antikörpertiter gegen Entenserum bei Masugi-Nephritis am Kaninchen. Man sieht, daß bei allen Tieren etwa gleichzeitig die Titer ansteigen und daß dem Anstieg des Titers der Beginn der Albuminurie nach kurzer Zeitspanne folgt. Ein Tier ohne wesentlichen Titeranstieg erkrankte nicht.
○ Beginn der Albuminurie, (70) = Rest-N im Blut; ×× Grad der histologischen Veränderungen.

Bei Kaninchen M 6 (Jungtier) wurde jeweils nur eine Bestimmung durchgeführt, da diesem Tier größere Blutentnahmen nicht zuzumuten waren. Nach genormter Inkubationszeit erkrankten die Tiere an G.N. Die Titer bleiben niedrig bis zum 4.—5. Tag, um dann steil anzusteigen und zwischen dem 7. und 9. Tag ein Maximum zu erreichen. Mit dem Anstieg des Titers fällt auch der Beginn der zum Teil massiven Albuminurie zusammen. Etwa dem Maximum des Titers entspricht histologisch die intensivste Ausprägung des Krankheitsbildes. 2 in diesem Stadium gestorbene Tiere zeigten histologisch eine schwere und eine schwerste diffuse Glomerulonephritis (Kaninchen K 864 und K 872). Bei einem dieser beiden Tiere (K 872) ergab eine kurz vor dem Tode durchgeführte Bestimmung des Reststickstoffes im Blute einen Wert von 235 mg%. Die A.K.-Titer sinken dann wieder ab. Sie sind in Abb. 2 graphisch wiedergegeben. Im einzelnen ergab die Untersuchung:

Kaninchen K 864 zeigt noch 3 Tage nach Injektion des Nephrotoxin keinen A.K.-Titer gegen Normal-Entenserum. Dieser steigt dann bis zum 5. Tage auf 0,01 mg N an, um am 7. Tage einen Wert von 0,10 zu erreichen. An diesem Tage starb das Tier. Eiweiß im Urin fand sich erstmalig ebenfalls am 7. Tage. Histologisch zeigte sich eine Verquellung der Glomeruluscapillaren. Sie erscheinen blutarm, das Mesoangium ist zellreich und mit zahlreichen Leukocyten durchsetzt. Der Raum der Bowmanschen Kapsel ist durchweg gut dargestellt. Im Goldner-Schnitt finden sich darin rötlich angefärbte, feingranulierte Niederschläge, die auch in den ausgeweiteten Tubuluskanälchen auftreten. Weiter distal bläulich angefärbte Zylinder

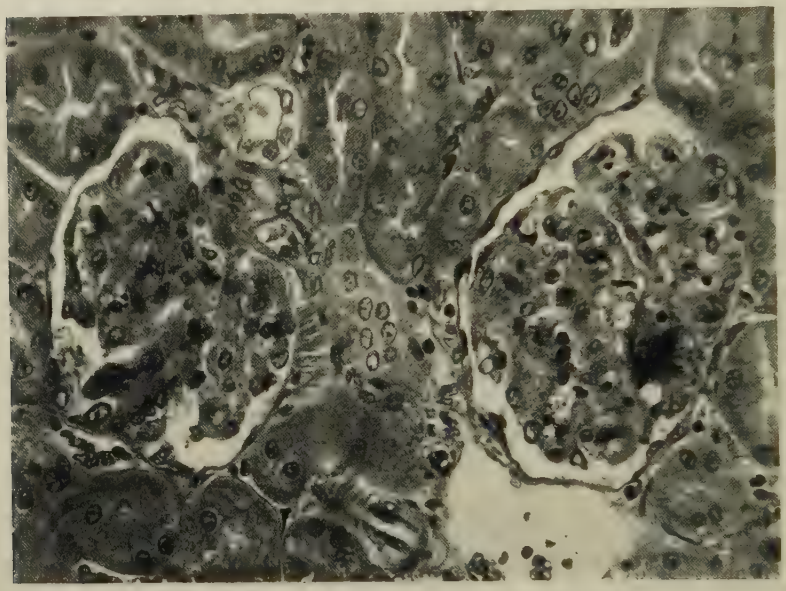


Abb. 3. Kaninchen K 875. Masugi-Nephritis. 7. Tag nach Injektion von 5 cm³ Nephrotoxin. Subakute intracapilläre Glomerulonephritis. Technische Daten wie Abb. 4.

und diffuse Niederschläge. Im Tubuli-recti-Bereich vereinzelt rötlich angefärbte Zylinder. Im Protoplasma der Epithelien zahlreiche kleine bis mittelgroße Vacuolen, ausgefüllt mit den gleichen rötlichen Niederschlägen, wie sie auch im Tubuluslumen anzutreffen sind. Akute diffuse intracapilläre Glomerulonephritis.

Bei K 876 bis zum 3. Tage kein Titer. Am 5. Tage wird ein Wert von 0,02 erreicht, der am 7. Tage bis auf 0,135 angestiegen ist. Dieser Titer fällt bis zum 11. Tage auf 0,034 ab. An diesem Tage Tod des Tieres unter dem klinischen Bild der Urämie mit einem Rest-N-Wert von 233 mg% Stickstoff. Histologisch: Weitgehende Zerstörung der Glomerulusstruktur mit Umwandlung der Capillaren in hyaline Bänder. Verbreiterung des Mesoangiums, teilweise Verklebung der hyalinen Bänder mit dem an vielen Stellen mehrschichtigen Kapselepithel. Ausfüllung des Glomerulusspaltes, soweit er noch sichtbar ist, mit Eiweißniederschlägen. Ausweitung der Tubuluskanälchen und Anfüllung mit Eiweißniederschlägen, Eiweißzylindern und abgestoßenen Tubulusepithelien. Epithelnekrosen besonders in den Zwischenstücken und distalen Abschnitten. In den Gefäßscheiden von Mark und Rinde diffuse Rundzellenansammlung, vorwiegend im venösen Schenkel. Subakute, vorwiegend

intracapilläre Glomerulonephritis mit reaktiver Verdickung des äußeren Blattes der Bowmanschen Kapsel.

K 872. Bis zum 3. Tage kein Titer, am 6. Tage setzte klinisch das Krankheitsbild einer schweren Nephritis ein, so daß hier von einer Blutentnahme abgesehen wurde. Tod des Tieres am 8. Tage unter den Zeichen einer Urämie mit einem Rest-N-Wert von 235 mg Stickstoff und einem Titer von 0,068. Eiweiß im Harn erstmals am 7. Tag. Bei der histologischen Untersuchung zeigte sich Quellung der Glomeruluscapillaren und teilweise Verklebung mit dem Blatt der äußeren Kapsel sowie vermehrtes Auftreten von Rundzellen. Soweit sie erhalten ist, erscheint die Lichtung

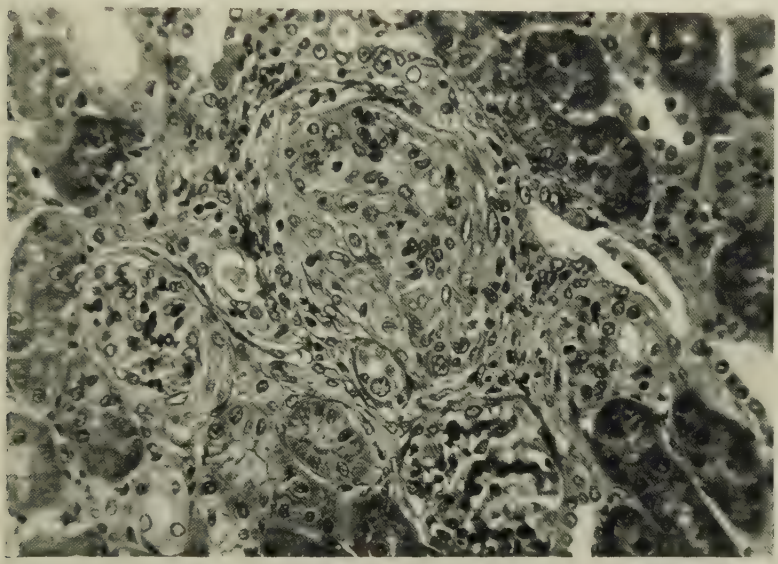


Abb. 4. Versuchstier KM 5. Masugi-Nephritis. 14. Tag nach der Injektion von 5 cm³ Nephrotoxin. Subakute, vorwiegend extracapilläre Form der diffusen Glomerulonephritis. Bouin/Paraffin Goldner. Mikrophoto. Apochromat 25,0, Optovar 1, Okular 8, Aperturblende 2, Belichtung ½ sec, Kleinbild, vergrößert auf 9 × 12.

der Bowmanschen Kapsel durchweg optisch leer. Ausweitung der Tubuluscapillaren, in denen sich abgestoßene Epithelien und im Bereich der Zwischen- und distalen Hautstücke diffuse Eiweißniederschläge finden. In den Tubuli-recti Eiweißzylinder. In den Epithelien der Tubuli finden sich teils optisch leere, teils mit rötlich gefärbten Niederschlägen angefüllte Vacuolen, vorwiegend im basalen Bereich. Auflockerung des intertubulären Gewebes. Nekrose der Gefäßwandmuskelzellen im Bereich der kleinen Arterien. In diesen Abschnitten springen die Gefäßwandendothelien knopfartig ins Lumen vor, während das perivasculäre Bindegewebe aufgelockert und von Rundzellen infiltriert erscheint. Akute intracapilläre Glomerulonephritis.

K 875. Kein Antikörper-Titer bei der Untersuchung am 2. Tage. Am 5. Tage erreicht der Titer steilansteigend einen Wert von 0,036, um bis zum 7. Tage, dem Todestage, wieder auf 0,004 abzusinken. Auch hier klinisch das Krankheitsbild einer Glomerulonephritis mit dem Auftreten von Albumin im Harn vom 6. Tage an. Bei der histologischen Untersuchung zeigt sich Schwellung der Glomerulusschlingen und teilweise Umwandlung in hyaline Bänder. Verbreiterung des Mesoangiums. Die Capillarschlingen sind weitgehend blutleer. In anderen Gebieten sind die Schlingen

mit der äußeren Kapsel verklebt. Die Capillaren der marknahen Rindenabschnitte und des übrigen Interstitiums sind reichlich mit Erythrocyten angefüllt. Rundzellenansammlung um die Gefäßscheiden von Mark und Rinde. Zwischenstücke und Tubuli recti sind zum Teil ausgeweitet und mit Eiweißzylindern und abgestoßenen Tubulusepithelien angefüllt. Zellnekrosen in den Zwischenstücken, weniger in den Hauptstücken. In diesen Zwischenstücken Ablösung des Epithels und Kernschwellung. Subakute intracapilläre Glomerulonephritis.

K M 5. Die Bestimmung der Antikörper-Titer wurde erstmalig am 6. Tage durchgeführt, als der Titer bereits einen Wert von 0,07 erreicht hatte. Er hält sich etwa 4 Tage auf dieser Höhe, um bis zum 14. Tage auf 0,022 abzusinken. An diesem Tage starb das Tier mit einem Rest-N-Wert im Blute von 70 mg%. Eiweiß im Urin war erstmalig am 8. Tage nach der Injektion aufgetreten. Histologisch: Während einzelne Nephrone mit fast normaler Struktur angetroffen werden, zeigt die überwiegende Mehrzahl eine deutliche Verquellung und Blutarmut der Glomeruluscapillaren. Verklebung der einzelnen Schlingen miteinander sowie mit dem äußeren Kapselblatt. Zwischen einzelnen Schlingen sowie im Raum der Kapsel finden sich im Goldner-Schnitt diffuse rötlich gefärbte Niederschläge. Das angrenzende Epithel der Kapsel ist mehrschichtig und zeigt Halbmondbildung. Vorwiegend in den distalen Kanälchenabschnitten teils bläulich, teils rötlich gefärbte Zylinder, im Protoplasma der Epithelien zahlreiche Vacuolen wechselnder Größe, teils optisch leer, teils mit rötlich granulierten Niederschlägen und hyalinen Schollen unterschiedlicher Größe angefüllt. Einzelne Epithelnekrosen vor allem in den distalen Bereichen. Subakute vorwiegend extracapilläre Form der diffusen Glomerulonephritis.

K M 6. Während es sich bei den vorhergehenden 5 Tieren um ausgewachsene Kaninchen mit einem Lebensalter von mindestens 8 Monaten handelte, war dieses Tier ein Jungtier von 3½ Monaten. Diese Jungtiere bilden erfahrungsgemäß bei Immunisierungen nur geringe Titer. Auch in unserem Fall erfolgte nur ein träger Anstieg des Titers um 0,013 am 5. Tage, um insgesamt 0,017 am 9. Tag. Dieser Titer fiel dann ebenso träge wieder ab. Klinisch ließen sich Zeichen einer Erkrankung an Glomerulonephritis nicht erheben. Die Probeexcision aus einer Niere am 11. Tage ergab bei der histologischen Untersuchung ein völlig normales Nierenbild.

Die Einordnung dieser Ergebnisse findet sich zusammen mit denen der Gamma-Globulin-Nephritis unter „Besprechung".

b) Untersuchungen über die Bindungszeit des Nephrotoxin.

Sarre und Wirtz (1939) klemmten eine Nierenarterie 15—20 min lang ab und gaben während dieser Zeit das nephrotoxische Entenserum. Danach wurde die Klemme wieder entfernt. Es zeigte sich nun, daß die vorher abgeklemmte Niere später nicht an einer G.N. erkrankte, während die andere Seite davon befallen wurde. Die spezifisch gegen Niere gerichteten A.K. des Entenserum müssen also in sehr kurzer Zeit in der durchbluteten Niere gebunden worden sein. Klemmten die Autoren beide Nieren ab, so erkrankten später beide Nieren geringer — die A.K. wurden dann wohl zum Teil im übrigen Körper gebunden.

Wir haben nun versucht, serologisch den Schwund dieser gegen Niere gerichteten A.K. aus dem strömenden Blut des Kaninchens festzustellen. Kurz vor, während und dann in Zeitabständen von wenigen Minuten nach der Injektion des Serum wurde bei 2 Kaninchen aus der Ohrvene Blut entnommen und das erhaltene Serum gegen eine Lösung von Niereneiweiß als Antigen präzipitiert (s. Abb. 5). Wir haben dabei in Kauf genommen, aus dem großen Spektrum der gegen Niere gerichteten A.K. des Nephrotoxin nur den Teil erfaßt zu haben, dessen korrespondierende Antigene sich in unserem Kochsalzextrakt löslich darstellen

ließen. Jeder der auf Abb. 5 durch einen Punkt gekennzeichneten Werte ist doppelt bestimmt. Die Punkte ○ geben die Werte von Tier I und die Punkte • die von Tier II wieder. Während der Anfangstiter bei 0,10 mg Stickstoff pro 1,0 cm³ Serum liegt, fällt er in der 6. min bereits auf den 4. Teil ab, um dann langsam weiter sinkend nach 40 min einen Wert von 0,01 zu erreichen.

Es zeigte sich also, daß nach 10—12 min der weitaus größte Teil des Nephrotoxin aus dem strömenden Blut verschwunden ist. Auf die Übereinstimmung dieses Befundes mit den Ergebnissen der oben angeführten Abklemmversuche wird unter „Besprechung" eingegangen.

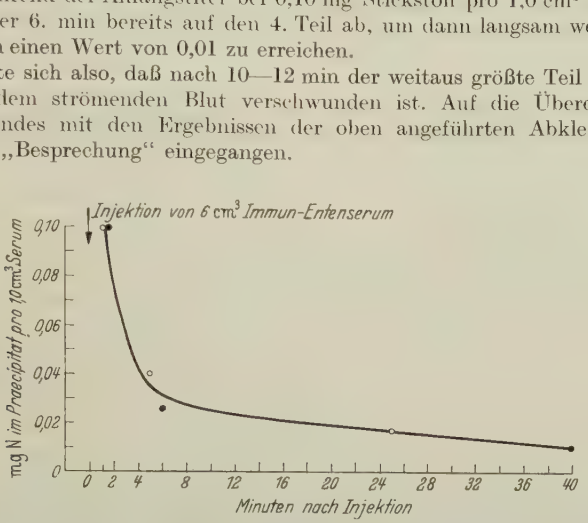


Abb. 5. Schwund der gegen Kaninchenniere gerichteten Antikörper des Entenserum aus dem Blut des Kaninchens. Die „nephrotoxische Komponente" des Entenserum ist nach wenigen Minuten aus der Blutbahn geschwunden.
Präcipitation von Kaninchenserum gegen Nierenextrakt. ○ Tier I, • Tier II.

II. Die Gamma-Globulin-Nephritis.

Die Versuchsanordnung von Hawn und Janeway wurde wiederholt und dabei eine quantitative Bestimmung des Titers der Kaninchen gegen Rinder-Gamma-Globulin vorgenommen*. Es zeigte sich, daß eine einmalige Injektion von 4 g Gamma-Globulin genügte, um bei 3 unserer 5 Versuchstiere eine Nephritis auszulösen (Abb. 6). Bis zum 7. Tag findet sich ein sehr langsamer Anstieg des Titers auf etwa 0,015 mg N im Präzipitat pro 0,5 cm³ Serum. Vom 7.—9. Tage an erfolgt dann ein steilerer Anstieg der Kurve. In dieser Zeit fällt auch der Beginn des Auftretens der Albuminurie. Die Tiere starben am 12. bzw. 14. Tag nach der Injektion. Bei der histologischen Untersuchung fand sich das ausgeprägte Bild einer akuten G. N. Ein Tier zeigte keinen Anstieg des Titers und keine G. N., ein Tier starb am 4. Tag nach der Injektion ohne klinischen oder histologischen Nierenbefund im Sinne einer Nephritis. Im einzelnen ergab sich:

Kaninchen K 852: Den Titeranstieg gibt Abb. 6 wieder. Eiweiß im Urin erstmalig am 9. Tag nach der Injektion. Bei der histologischen Untersuchung zeigen

* Für die freundliche Überlassung der benötigten Versuchsmengen an Gamma-Globulin sei hier der Firma Armour Laboratories Inc., USA, und den Behring-Werken, Marburg herzlich gedankt.

sich die Glomeruluscapillaren relativ blutarm. Über den ganzen Schnitt verteilt zahlreiche Verklebungen einzelner Schlingen mit dem äußeren Blatt der Bowmanschen Kapsel.

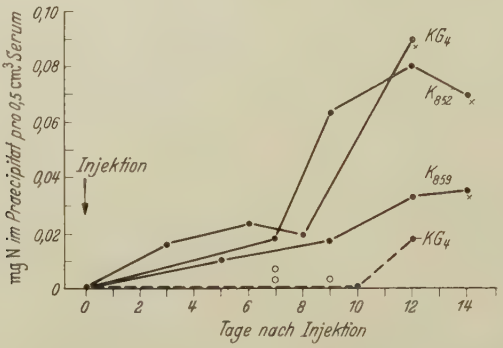


Abb. 6. Anstieg der A.K. gegen das einmalig zugeführte Rinder-Gamma-Globulin bei Gamma-Globulin-Nephritis am Kaninchen. Auch bei diesen Tieren Übereinstimmung von Titeranstieg und Beginn der Albuminurie.
• — • Titer gegen γ-Globulin; c---c Titer gegen Niere bei KG_4; ○ Beginn der Albuminurie.

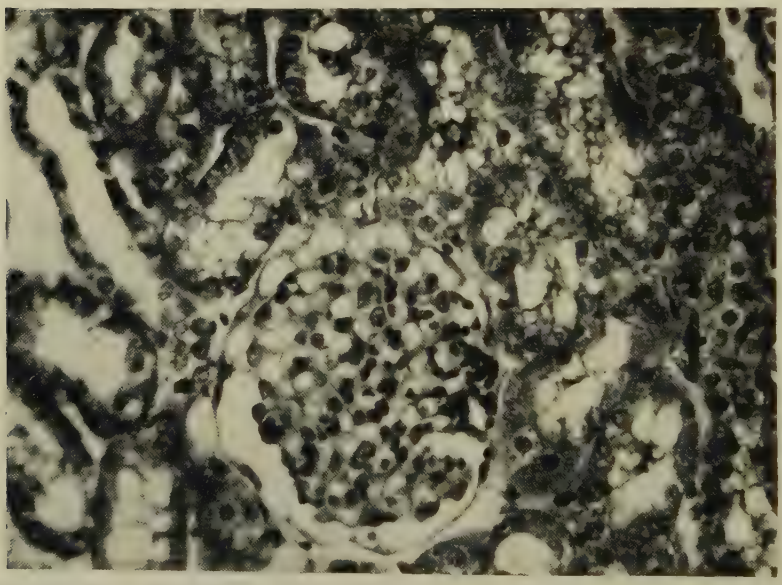


Abb. 7. Kaninchen K 852. Gamma-Globulin-Nephritis. 14. Tag nach Injektion von 4 g Gamma-Globulin i.v. Leichte intracapilläre Glomerulonephritis (subakut) mit vorwiegend degenerativen Tubulusepithelveränderungen. Typisch für Gamma-Globulin-Nephritis, die stark von der Masugi-Nephritis abweicht und mehr degenerativen Charakter trägt. Technische Daten wie Abb. 4.

Der Kapselspalt ist durchweg gut sichtbar und im HE-Präparat vereinzelt mit rot-bläulich-körnigen Niederschlägen angefüllt. Diese Niederschläge finden sich weitaus häufiger in den meist ausgeweiteten Tubuluskanälchen, während sie in den Sammelröhren zu homogenen Zylindern vermehrt sind. In die Zylinder eingebettet

finden sich zahlreiche pyknotische Zellkerne. Die Epithelien der proximalen Hauptstücke zeigen eine sehr unregelmäßige Begrenzung des Lumens. In ihrem Protoplasma zahlreiche, im HE-Präparat teils optisch leere, teils mit hyalinen Tropfen angefüllte Vacuolen. Teils isolierte, teils reihenweise Kernverdichtungen. An vielen Stellen sind nekrotische Zellen von der Basalmembran abgehoben und ins Lumen abgestoßen. Intracapilläre Glomerulo-Nephritis mit schweren degenerativen Tubulus-Epithelveränderungen.

Kaninchen G 4: Eiweiß im Urin wurde erstmalig am 7. Tage nach der Injektion nachgewiesen. Histologisch zeigen einzelne Glomeruli ein Bild wie das bei K 852 beschriebene, wobei nur selten Wucherungen des Kapselepithels auftreten, während die Mehrzahl unauffällig ist. Auch die degenerativen Tubulusveränderungen sind weniger auffällig. Vereinzelte Epithelabstoßungen ins Lumen sind nachweisbar, ebenso im HE-Präparat Ablagerungen von wolkigen, rotbläulichen Strukturen, die sich weiter distal in den Sammelröhren zu homogenen Eiweißzylindern formieren. Geringfügige intracapilläre Glomerulo-Nephritis mit leichten degenerativen Tubulus-Epithel-Veränderungen.

Kaninchen K 859: Eiweiß im Urin erstmalig am 7. Tage nach der Injektion. Bei der histologischen Untersuchung zeigt sich ein Befund, der dem von KG 4 entspricht.

Die Bestimmung der Rest-N-Werte im Blute wurde bei den Gamma-Globulintieren nicht durchgeführt. Bei der histologischen Untersuchung der Tiere fiel auf, daß perivasculäre Rundzelleninfiltrate, wie sie sich bei den Bildern der Masugi-Nephritis zeigten, hier nicht anzutreffen waren. Die Besonderheiten der Gamma-Globulin-Nephritis, die unseres Erachtens sehr von der Masugi-Nephritis abweicht, werden in der Gesamtveröffentlichung der Arbeitsgemeinschaft erörtert werden.

Bei 4 weiteren Versuchen mit Gamma-Globulin einer anderen Herstellerfirma konnte das Auftreten einer G.N. nicht beobachtet werden, obwohl sich ein A.K.-Titer gegen Gamma-Globulin bei zweien dieser Tiere fand.

Besprechung.

Der allergische Charakter der im Masugi-Experiment zur G.N. führenden Vorgänge erscheint heute gesichert. Masugi hatte in seiner Arbeit die Antigen-Antikörper-Reaktion (A.-A.-R.) zwischen Nephrotoxin und Niereneiweiß als Ursache der Erkrankung angesehen. Obwohl die Möglichkeit allergischer Reaktionen im Verlaufe des Experimentes nie bestritten wurde, sind doch häufig Zweifel an der ursächlichen Bedeutung solcher Reaktionen für den Ausbruch der Erkrankung geäußert worden. Die Alternativ-Vorstellung einer Toxinwirkung als pathogenes Prinzip ist jedoch durch die Ergebnisse der experimentellen Forschung widerlegt und fallengelassen worden.

Bei genaueren Untersuchungen zeigte es sich aber, daß die These von Masugi, die nur von einer A.-A.-R. zwischen Nephrotoxin und Niere spricht, für die Erklärung der Pathogenese der experimentellen G.N. nicht ausreicht. Sie erklärt nicht die genormte Inkubationszeit von 6—8 Tagen, die von der Nephrotoxin-Injektion bis zum Ausbruch der Erkrankung vergeht. Diese Inkubationszeit ist um so auffälliger, als das krankmachende Agens innerhalb weniger Minuten in der Niere

gebunden ist. Durch diese Gedanken angeregt, hat vor allem Kay (siehe unten) experimentell die Masugische These erschüttert.

Die Festigkeit der Fixierung ist außerordentlich groß. Wartet man nämlich 10 min nach Injektion des Nephrotoxin und gibt dann eine Aufschwemmung von Nierenbrei in die Arteria renalis des Versuchstieres, so tritt trotzdem die G.N. in gleicher Schwere wie bei Kontrollen auf (Sarre 1939). 10 min nach der Injektion vermag also selbst das spezifische Antigen die Bindung der Nieren-A.K. an der Glomerulusmembran nicht mehr zu lösen.

Diese Bindung des Nephrotoxin in der Niere sei im folgenden als „Phase-I-Reaktion" bezeichnet. Ohne sie kommt es nicht zum Ausbruch der Erkrankung. Beweis: Die Abklemmversuche von Sarre. Smadel injizierte gleichzeitig mit dem Nephrotoxin Nierenbrei und konnte so den Ausbruch der G.N. verhindern. Hier hatte also die Reaktion der A.K. mit dem Nieren-Antigen schon in der Blutbahn und vor dem Erreichen der Nieren stattgefunden. Mit anderen Organextrakten, z. B. der Leber, ist bei der Versuchsanordnung von Smadel der Ausbruch der G.N. nicht zu verhindern, ein Beweis für die hohe Spezifität der Reaktion. Im Gegensatz dazu beschreibt aber Kashiwabara Versuche, in denen es gelungen ist, das Nephrotoxin durch Adsorption an Erythrocyten hämolysinfrei zu machen. Mit diesem „Nephrotoxin" konnte er eine Nephritis nicht mehr auslösen.

Es muß hier auf die Frage der Organspezifität und die damit zusammenhängenden Beobachtungen über die wirksame Antigenfraktion des Nierenbreis sowie auf die Lokalisation der Nieren-A.K. nach ihrer Injektion näher eingegangen werden. Wie schon erwähnt, zeigte bereits Masugi, daß die Organspezifität seines Nephrotoxin nur relativ ist. Er konnte mit ihm Präzipitationen auch gegen Leber- und Herzemulsionen erzielen. Er beschreibt ferner, daß sich Folgen der Nephrotoxininjektion nicht nur am Glomerulus, sondern auch an den Lebercapillaren und überhaupt weit verteilt am arteriellen System als Periarteriitis nodosa nachweisen lassen.

Pressman, Hill und Foote, und Pressman und Keigley stellten bei sehr exakten Mäuseversuchen mit radioaktiv markierten A.K. die Lokalisation der Nieren-A.K. im Glomerulus der behandelten Tiere fest. Andererseits fanden Pressman und Sherman bei Versuchen mit Anti-Rattennieren-Serum und Anti-Rattenlungen-Serum auch eine andere Lokalisation der A.K. als in den homologen Organen. Nieren-A.K. sind hauptsächlich in der Niere, jedoch auch in Leber, Lunge und anderen Organen lokalisiert, ein Ergebnis, das ein wichtiger Beweis für die Unspezifität der Organ-Antiseren zu sein schien. In Fortführung ihrer Untersuchungen fanden die Autoren bei Versuchen mit Anti-Lungen-Serum und Anti-Leber-Serum wohl die höchsten Konzentrationen der A.K. in der Lunge bzw. der Leber, jedoch wurde ein *größerer Prozentsatz in der Niere fixiert* als es beim Anti-Nieren-Serum in der Lunge oder der Leber der Fall war. Es lag also eine deutliche Bevorzugung der Niere vor. Wurden die A.K. aus den Geweben wieder ausgewaschen

und dann erneut injiziert, so verteilten sie sich zwar auf alle Organe, zeigten aber eine gesteigerte Affinität zu dem Organ, aus dem sie vorher ausgewaschen worden waren. Neben dem serologisch-allergischen Mechanismus ist bei der Deutung dieser Befunde die Funktion der einzelnen Organe und insbesondere die *Ausscheidungs-Funktion der Niere* zu berücksichtigen.

Nicht nur die Spezifität des Nephrotoxin, sondern ebenso auch die seines korrespondierenden Antigen wurden genauer untersucht. Tsuji, Seegal u. a. fanden, daß sich Nierenschäden und selbst Nephritiden mit Antiseren erzeugen lassen, die durch Verwendung von Placenta-, Muskel- und anderen Organextrakten als Antigen gewonnen wurden. Im Gegensatz dazu scheinen die Ergebnisse von Krakower und Greenspoon zu stehen. Sie stellten Untersuchungen an mit dem Ziel, die Vielzahl von Antigenen, die sich in dem zum Immunisieren verwandten Nierenbrei finden, möglichst bis auf eine Komponente einzuschränken. Diese eine Komponente sollte ausreichend sein, in den Antikörper liefernden Tieren das nephrotoxische Serum zu erzeugen. Es zeigte sich, daß die antigene Wirkung von den Kern- und Plasmanucleoproteiden der Zellen des visceralen Glomerulusanteils ausgeht. Die Basalmembran ist weit wirksamer als eine Mischung von visceralen Epi- und Endothelzellen. Der parietale Glomerulusanteil ist nicht antigen im Sinne der Bildung eines nephrotoxischen Serum.

Bei der Bearbeitung der Fragen der Spezifität der Organ-Antiseren sowie ihrer Antigene scheinen sich also in wesentlichen Punkten Widersprüche zu ergeben. So stehen einmal den Ergebnissen von Tsuji, Seegal u. a. (mangelnde Spezifität des Antigen) die von Krakower und Greenspoon (hohe Spezifität) und andererseits den Ergebnissen von Masugi u. a. (mangelnde Spezifität des Organ-Antiserum) die von Smadel gegenüber (hohe Spezifität bei Absorptionsversuchen). Man kann für diese scheinbaren Widersprüche vielleicht folgende Deutung anführen:

Das antigen wirksame Agens bei der Herstellung des Nephrotoxin sind bestimmte Eiweißstrukturen der Basalmembran der Glomeruluscapillaren. Die Fixation der A. K. auch im Capillargebiet anderer Organe wird durch die „überschneidende Eigenschaft" „Capillare" bewirkt, während die Eigenschaft „Glomerulus-Capillare" genügend unterschiedlich gegen andere Capillaren ist, um die vorherrschende Bindung im Glomerulus zu erklären. Umgekehrt müßte man dann sagen, daß die nephrotoxische Eigenschaft heterologer Organ-Antiseren bei gleicher Species auf dem Vorhandensein bestimmter Eiweißstrukturen der Basalmembran von Capillaren der betreffenden als Antigen verwandten Organe beruht. Die betreffenden Organ-Antiseren sind dann zum mehr oder weniger großen Teil „Capillar-Antiseren" und reagieren unter anderem auch mit den Capillaren der Niere. Zu überlegen ist aber auch, ob nicht vielleicht die Streubreite der Wirkung von Organ-Antiseren mit auf der

Wirkung von A.K. beruht, die bei der Immunisierung gegen die betreffende Species allgemein gebildet werden.

Diese Deutung allein bleibt jedoch unbefriedigend. Sie ist nicht zu vereinbaren mit der deutlichen Bevorzugung der Niere bei der Fixation von nicht gegen Niere gerichteten A.K., insbesondere nicht mit dem Ausbruch einer G.N. nach Serumgaben mit Antikörpern gegen Muskel oder Placenta. Sarre wirft die Frage auf, ob vielleicht die gleichzeitige Eigenschaft des Glomerulus als Capillare und als „Parenchym" bei der Fixation eine Rolle spielt. Zweifellos handelt es sich im Glomerulus um wesentlich weiter bzw. anders differenzierte Capillaren als im übrigen Organismus. Funktionen und Leistung der Glomeruluscapillaren als „Ausscheidungsorgan" weichen soweit von denen anderer Capillaren ab, daß ihre Struktur auch immunbiologisch von anderen Capillaren abweichen wird.

Die oben beschriebene „Phase-I-Reaktion" ist also für den Ausbruch der Erkrankung unerläßlich. Andererseits macht sie allein aber noch keine Nephritis. Nach einem erscheinungsfreien Intervall von 5—7 Tagen nach der Injektion setzt die Erkrankung ein. Das ist gleichzeitig der Zeitpunkt, in dem zuerst A.K. gegen das Eiweiß des das Nephrotoxin liefernden Tieres auftreten (Abb. 2). Kay veranlaßte diese Beobachtung, die Bedeutung der bisher vernachlässigten aktiven Immunisierung der Versuchstiere zu überprüfen. Wenn er nach der Nephrotoxininjektion durch Röntgen-Ganzbestrahlung die aktive Bildung von A.K. gegen das mit der Injektion zugeführte Fremdeiweiß verhinderte, so blieb die G.N. aus. Gegenbeweis: Nach Zuführung von homologem Blut, das A.K. gegen das betreffende Fremdeiweiß enthält, kommt es sofort zum Ausbruch der G.N. Ähnliche Ergebnisse erhielten Spühler und Zollinger durch Cortisonbehandlung. Allerdings ist bei den Cortisonversuchen der Einwand naheliegend, es sei durch das Cortison die Fähigkeit der Tiere zu entzündlichen Reaktionen überhaupt herabgesetzt. Jedenfalls gelingt die Verhinderung einer experimentellen G.N. nach Unterbindung der aktiven A.K.-Bildung des Versuchstieres gegen das zugeführte Fremdeiweiß. Die „Phase-II-Reaktion", d. h. die A.-A.-R.-Reaktion der aktiv gegen das zugeführte Fremdeiweiß gebildeten A.K. mit den in der Niere im Verlauf der „Phase-I-Reaktion" fixierten Fremdeiweiß-A.K., ist also ebenfalls für den Ausbruch der G.N. Bedingung.

Kay hat auf Grund seiner Experimente eine Arbeitshypothose aufgestellt, der wir uns anschließen. In ihr widersprechen sich die angeführten Ergebnisse sowie auch die der eigenen Untersuchung nicht, sondern ergänzen einander: Der gegen Niere gerichtete Anteil des Nephrotoxin wird, wie Sarre und Wirtz fanden, innerhalb weniger Minuten in der Niere gebunden. Der nicht in der Niere fixierte Teil kreist in der Blutbahn, wirkt dort als Antigen und löst somit die Produktion von Antikörpern gegen das Eiweiß des Nephrotoxin aus. Diese A.K. treten nach 4—6 Tagen auf. Ihre Reaktion mit dem im Blute kreisenden Eiweiß des Nephrotoxin ist für den Ausbruch der G.N. unerheblich, die Reaktion

mit dem in der Niere fixierten Nephrotoxin jedoch löst die Erkrankung aus.

Nach den Untersuchungen von KAY vermutete SARRE, daß ähnliche Mechanismen vielleicht auch anderen Formen experimenteller G. N. zugrunde lägen. Wir haben diesen Gedanken besonders verfolgt und möchten hier auch für die G.N. durch Injektion von gereinigtem Rinder-Gamma-Globulin das besprochene pathogenetische Prinzip zur Diskussion stellen. Auch bei der Gamma-Globulin-Nephritis tritt die Erkrankung nach einer genormten Inkubationszeit auf. 7—8 Tage nach einmaliger Injektion von Rinder-Gamma-Globulin kam es bei 3 von 5 Versuchstieren zum Ausbruch einer G.N. Diese Latenzzeit entspricht der bei den MASUGI-Experimenten beobachteten. Die Schnelligkeit der Fixation der Gamma-Globuline in der Niere oder ihres Schwundes aus der Blutbahn wurde bisher nicht untersucht, jedoch konnten HAWN und JANEWAY das Antigen in der 2. Woche nach Injektion im strömenden Blute nicht mehr nachweisen. SARRE (1952, unveröffentlicht), gelang es in keinem Fall durch einseitige Abklemmung einer Nierenarterie für 20 min während und nach Injektion des Rinder-Gamma-Globulin die Nephritis gegenüber der anderen Seite zu beeinflussen. Die Fixation des Gamma-Globulin geht also nicht so schnell und vollkommen vor sich, wie das bei den spezifisch gegen die Niere gerichteten A.K. des MASUGI-Serum der Fall ist. COONS, LEDUC und KAPLAN untersuchten die Lokalisation der Gamma-Globuline und fanden sie in den Zellen des Reticuloendothels, des Bindegewebes, des Gefäßendothels, des Epithels der Nierentubuli, in den Lymphocyten von Milz- und Lymphknoten, in der Leber und ganz wenig in der Nebenniere. Die Globuline waren bis zu 8 Tage nach der Injektion nachweisbar. Eine Abbildung aus dieser Arbeit zeigt das Haften der Globuline allein in den Capillaren der Glomeruli.

Auch bei der Gamma-Globulin-Nephritis wurde keine Erkrankung ohne Auftreten eines Titers gegen Gamma-Globuline beobachtet, und zwar stieg dieser Titer gleichzeitig mit Einsetzen der klinischen Symptome oder sehr kurz danach an (Abb. 6). Das entspricht auch den Ergebnissen von HAWN und JANEWAY, obwohl diese in einigen Fällen eine G.N. ohne Anstieg des Titers in der 1. Woche beobachteten. In diesen Fällen fehlt aber die weitere Untersuchung über die ersten 7 Tage hinaus. Es ist ja auch zu erwarten, daß sich nachweisbare Mengen von A.K. erst dann finden lassen, wenn diese im Überschuß dem Antigen gegenüber gebildet werden. Solange sie noch mit ihm reagieren, werden sie nur sehr schwer nachweisbar sein. SUSSMANN und FREED konnten bei Kaninchen mit homologen Gamma-Globulinen eine G.N. nicht auslösen, während charakteristische glomuläre und tubuläre Veränderungen infolge der Steigerung des Serumglobulinspiegels festzustellen waren.

Leider wurden bei diesen Versuchen Bestimmungen des Titers gegen das Gamma-Globulin nicht vorgenommen. Es ist aber anzunehmen, daß eine A.K.-Bildung gegen das homologe Eiweiß nicht stattgefunden hat. Aus den genannten Untersuchungen läßt sich der Schuß ziehen, daß analog der Beobachtung bei Masugi-Nephritis die Erkrankung ohne eine aktive Bildung von A.K. gegen das zugeführte Gamma-Globulin als Antigen nicht auszulösen ist.

Andererseits aber zeigen nicht alle Fälle, die einen Titer gegen das Antigen bilden, eine Nephritis. Es muß also noch eine weitere Bedingung erfüllt sein: Die Haftung der Antigene in der Niere. Bei Verwendung von Rinder-Gamma-Globulin einer anderen Firma konnte bei 4 Versuchstieren eine G.N. nicht erzielt werden, auch in den 2 Fällen nicht, in denen ein Titer gegen das Globulin nachweisbar war. Diese Gamma-Globuline haften eben nicht in dem hohen Maße in der Niere, wie das bei den spezifisch gegen Niere gerichteten A.K. im Masugi-Experiment der Fall ist. Warum sie überhaupt haften, und zwar in wesentlich höherem Maße in der Niere als in anderen Organen, ist eine Frage, die bei der Gamma-Globulin-Nephritis ebensowenig beantwortet werden kann, wie bei der Erörterung der bevorzugten Haftung der Organ-Antiseren in der Niere (siehe oben).

Auch für die G.N. durch Rinder-Gamma-Globuline muß also ein zweiphasischer Verlauf angenommen werden: 1. Die Haftung des Antigen in der Niere, worauf dann 2. die aktive Bildung von A.K. gegen die noch im Blut kreisenden Reste des Antigen erfolgt. Diese A.K. reagieren mit dem in der Niere gebundenen Teil der Antigenmenge und lösen die Erkrankung aus. Die Versuche mit Gamma-Globulin beweisen, daß das zur Auslösung einer G.N. wesentliche Prinzip lediglich die Zuführung eines Fremdeiweißes in die Blutbahn ist. Als Stütze für diese These müssen ferner Experimente angeführt werden, bei denen es bei Kaninchen gelungen ist, durch Injektion von anderen Fremdeiweißen wie z. B. Pferdeserum oder Eiereiweiß eine Nephritis auszulösen. Auch unter Berücksichtigung der Experimente von Schwentker u. Complolier und Cavelti u. Cavelti läßt sich diese Deutung der pathogenetischen Vorgänge, die den verschiedenen Formen der experimentellen Nephritis zugrunde liegen, aufrecht erhalten. Auf die Frage der Auto-Antikörper-Bildung bei experimenteller G.N. soll jedoch in dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

Die Masugi-Nephritis sowohl als auch die Rinder-Gamma-Globulinnephritis erleichtern uns die Deutung der Pathogenese der menschlichen akuten diffusen Glomerulo-Nephritis, denn aus dem Experiment lassen sich folgende Forderungen ableiten, ohne deren Erfüllung es in keiner der verschiedenen Versuchsanordnungen zum Ausbruch der Erkrankung kommt:

1. Es muß ein Fremdeiweiß in die Blutbahn gelangen.

2. Das Fremdeiweiß muß in der Niere genügend fest fixiert werden, eine Forderung, die sich aus dem „Angehen" der G.N. in 100% der Fälle bei der Masugi-Nephritis ergibt, bei der die Fixation der Fremdeiweiße in der Niere außerordentlich rasch und schnell erfolgt. Bei der Gamma-Globulinnephritis dagegen ist diese Bindung weniger fest. Die Erkrankung geht nur in einem wechselnden Prozentsatz der Fälle an.

3. Das Versuchstier muß fähig sein, einen genügend hohen A.K.-Titer gegen das Fremdeiweiß zu bilden. Nimmt man für die Versuche Jungtiere, die bekanntlich niedrige Antikörpertiter geben, so bleibt die Erkrankung aus. Die entscheidende Stütze für diese 3. Forderung ist das Experiment von Kay, bei dem er durch Röntgenbestrahlung eine Antikörperbildung verhinderte. Die Erkrankung blieb dann aus. Gab er aber nachträglich homologes Serum mit Antikörpern gegen das Eiweiß des das Nephrotoxin liefernden Tieres, so trat die Erkrankung auf.

Zusammenfassung.

Die pathogenetische Bedeutung der Antikörperbildung bei verschiedenen Formen experimenteller Nephritis wird mit dem quantitativen Präzipitationsverfahren untersucht. Es findet sich:

1. Beim Masugi-Experiment ist der gegen Niere gerichtete Anteil des nephrotoxischen Serum schon nach wenigen Minuten post inj. fast völlig aus dem Blut der Versuchstiere verschwunden.

2. Bei der Masugi-Nephritis fällt der klinische Beginn der Erkrankung mit dem Auftreten von A.K. gegen das Eiweiß des Fremdserum zusammen.

3. Auch bei der Nephritis durch Rinder-Gamma-Globuline fällt der klinische Beginn der Erkrankung mit der aktiven Bildung von A.K. gegen das zugeführte Fremdeiweiß zusammen.

An Hand der Literatur und eigener Untersuchungen werden die Rolle der A.K. bei experimentellen Nephritiden besprochen und 3 Forderungen aufgestellt, ohne deren Erfüllung es in keiner der verschiedenen Versuchsanordnungen zum Ausbruch der Erkrankung kommt.

Literatur.

Coons, A., E. Leduc and M. Kaplan: J. of Exper. Med. **93**, 173 (1951). — Cavelti and Cavelti: Arch. of Path. **39**, 148 (1945); **40**, 103 (1945). — Grabar, P., et J. Oudin: Extr. Ann. Inst. Pasteur, Tôme **69**, 195 (1943). — Hawn and Janeway: J. of Exper. Med. **85**, 571 (1947). — Heidelberger, M.: J. of Exper. Med. **50**, 425 (1929) und frühere Arbeiten; **52**, 479 (1930). — Heidelberger and Kendall: J. of Exper. Med. **55**, 455 (1932). — Kashiwabara, M.: Mitt. Path. (Sandai), Bd. 8, 1933, 1935. — Kay, C.: J. of Exper. Med. **72**, 559 (1940). — Amer. J. Med. Sci. **204**, 483 (1942). — Krakower and Greenspoon: Arch. of Path. **51**, 6, 629 (1951). — Kussmaul u. Maier:

Dtsch. Arch. klin. Med. **1**, 484 (1866). — Masugi, M.: Ziegl. Beitr. **91**, 82 (1933). — Beitr. path. Anat. **91**, 82 (1933); **92**, 429 (1934). — Masugi, M., u. Sato: Virchows Arch. **293**, 615 (1934). — Masugi, M., u. Isibasi: Beitr. path. Anat. **96**, 391 (1936). — Pregl: Die quantitative organische Mikroanalyse, 2. Aufl. Berlin 1923, Bd. **113**, S. 119. — Pressman and Keighley: J. of Immunol. **59**, 141 (1948). — Pressman, Hill and Foote: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 65 (1949). — Pressman and Sherman: J. of Immunol. **67**, 21 (1951). — Sarre, H.: Dtsch. Arch. klin. Med. **183**, 515 (1939). — Sarre u. Wirtz: Dtsch. Arch. klin. Med. **189**, 1 (1942). — Klin. Wschr. **49**, 1548 (1939). — Sarre, H.: Dtsch. med. Wschr. **38**, 1158 (1952). — Schwentker and Comploier: J. of Exper. Med. **70**, 223 (1939). — Seegal and Loeb: J. of Exper. Med. **84**, 211 (1946). — Smadel and Swift: J. of Exper. Med. **65**, 559 (1937). — Spühler u. Zollinger: Referiert Kongreß f. Innere Krankheiten, Wiesbaden 1952. — Sussmann and Freed: Bioc. Biol. Amer. Med. **1951**, 355. — Tsuji, Sk.: Ziegl. Beitr. **98**, 425 (1937).

Ferner: Dethier, Ferrebee, McLean, Vonnghosband and Hamilton: Arch. of Path. **51**, Nr. 1, S. 1 (1951). — Ehrich: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **35**, 576 (1937). — Klinge u. Knepper: Zbl. allg. Path. **63**, 181 (1935). — More and Waugh: J. of Exper. Med. **89**, 541 (1949). — Sarre: Kongreß Inn. Med. Wiesbaden 1952. — Smadel: J. of Exper. Med. **64**, 921 (1936). — Smadel and Swift: J. of Immunol. **32**, 75 (1937).

Dr. Klaus Rother, Med. Univ.-Poliklinik, Freiburg i. Br.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 465—468 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Firma H. Lundbeck & Co. A/S, Kopenhagen.

Die Wirkung von Bienengift auf das Hypophysen-Nebennieren-System der Ratte.

Von

HANS WEIDMANN und ELLA MØLLER.

(Eingegangen am 6. Juli 1953.)

Seit langer Zeit ist Bienengift zur therapeutischen Beeinflussung rheumatischer Erkrankungen im Gebrauch. Seine Anwendung in der Therapie beruht in erster Linie auf empirischer Grundlage, liegen doch über den Wirkungsmechanismus bisher noch wenig gesicherte Grundlagen vor. Seit der Einführung von Cortison und ACTH in die Behandlung rheumatischer Erkrankungen sind zahlreiche Untersuchungen über die Wirkungsweise antirheumatischer Stoffe unternommen worden. So hat man sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch nach Verabreichung von Salicylaten eine Steigerung der sekretorischen Aktivität der Nebennieren nachgewiesen (BERTOLANI et al. 1951, BLANCHARD et al. 1950, CHAMPY u. DEMAY 1952, LOWENTHAL u. JAQUES 1953, ROSKAM et al. 1951, CRONHEIM et al. 1951, VAN CAUWEN-BERGE 1951, VAN CAUWENBERGE u. HEUSGHEM 1951, 1952). Die Frage einer ähnlichen Wirkung des Bienengiftes wurde zum ersten Male von NEUMANN und STRACKE (1951) aufgeworfen. Die vorliegenden Untersuchungen wurden vorgenommen, um abzuklären, ob Bienengift im Tierversuch zu einer Erhöhung der Nebennierenaktivität führen kann.

Methode.

Mit der Stimulierung der Nebennieren durch Corticotropin geht eine Herabsetzung ihres Ascorbinsäuregehaltes einher (SAYERS et al. 1944). Diese Ascorbinsäureherabsetzung kann zur quantitativen Beurteilung der sekretorischen Aktivität der Nebennieren herangezogen werden (SAYERS und SAYERS 1948, NASMYTH 1949). Verschiedene Substanzen, unter anderem Adrenalin, Histamin, Salicylsäure-, Cinchoninsäure- und Pyrazolonderivate bewirken bei der Ratte eine Herabsetzung der Ascorbinsäure in den Nebennieren. Alle diese Stoffe sind am hypophysenlosen Tiere unwirksam. Es muß daher angenommen werden, daß die Hypophyse der Vermittler ihrer die Nebennieren aktivierenden Wirkung ist.

Für die Versuche wurden männliche Ratten im Gewicht von 170—264 g verwendet. Alle Injektionen erfolgten intramuskulär. — *Intakte Ratten.* Intakte Ratten wurden mit Bienengift[1] bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung (Kontrollen) injiziert. 1½ Std nach der Injektion wurden den Tieren in Äthernarkose die Nebennieren

[1] Herrn Dr. FORSTER der Firma Heinrich Mack Nachf., Illertissen/Bay., danken wir bestens für die freundliche Überlassung von Bienen-Trockengift.

entfernt. *Hypophysektomierte Ratten.* Parapharyngeal hypophysektomierten Ratten wurde 21—25 Std nach der Operation in Äthernarkose die linke Nebenniere entfernt und darauf das Bienengift injiziert. 1½ Std nach der Injektion wurde die rechte Nebenniere exstirpiert. - Die Nebennieren wurden sofort nach der Exstirpation sorgfältig von Bindegewebe und Fett gereinigt, gewogen und homogenisiert. Die Ascorbinsäure wurde nach der Methode Roe und Kuether (1943) bestimmt und ist in mg per 100 g Nebennierengewebe umgerechnet.

Resultate.

Bienengift, in genügend hohen Dosen (0,1—1,0 mg/kg) intramuskulär injiziert, führt zu einer Herabsetzung des Ascorbinsäuregehaltes der Nebennieren intakter Ratten (Tab. 2). Die Herabsetzung der Ascorbinsäure ist — im angewendeten Dosenbereich — proportional der injizierten Bienengiftmenge. Bei der hypophysektomierten Ratte hat die intramuskuläre Injektion von 1,0 mg/kg Bienengift keine Wirkung auf den Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren (Tab. 1).

Tabelle 1. *Wirkung von 1,0 mg/kg Bienengift intramuskulär auf den Ascorbinsäuregehalt der rechten Nebenniere hypophysektomierter Ratten.*

Ratte Nr.	Gewicht g	Ascorbinsäure (mg per 100g Nebenniere) li. Nebenniere	re. Nebenniere	Differenz
1	205	544	538	— 6
2	195	362	380	+ 18
3	264	341	350	+ 9
4	232	500	500	0
5	210	541	518	— 23
6	195	455	430	— 25
7	230	582	566	— 16
8	177	480	475	— 5
9	245	312	306	— 6
10	195	450	439	— 11
			Mittelwert	— 7

Um die Wirkung des Bienengiftes mit einem bekannten Stoff in quantitative Beziehung bringen zu können, wurde das Natriumsalz der Salicylsäure in die Untersuchungen mit einbezogen. Aus den in Tab. 2 wiedergegebenen Resultaten geht hervor, daß 400 mg/kg Natriumsalicylat den Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren in annähernd gleichem Maße herabsetzen wie 1,0 mg/kg Bienengift, i. e. 53 bzw. 60%. Zieht man in Betracht, daß die wirksame bzw. wirksamen Komponenten nur einen Bruchteil des als uneinheitliches Stoffgemisch vorliegenden „Bienengiftes" ausmachen, so muß man für diese im Vergleich zu Natriumsalicylat zu einem noch wesentlich günstigeren absoluten Wirkungsverhältnis kommen. Der Wirkungsindex, d. h. das Verhältnis zwischen den toxischen und den im Ascorbinsäuretest gleich wirksamen Dosen der

beiden Stoffe an der Ratte beträgt für Bienengift über 30, für Natriumsalicylat etwa 2. Relativ, im Vergleich zur Toxizität, ist also Bienengift im Ascorbinsäuretest an der Ratte mindestens 15mal wirksamer als Natriumsalicylat.

Tabelle 2. *Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren männlicher intakter Ratten 1½ Std nach intramuskulärer Injektion von Bienengift und Natriumsalicylat.*

Substanz	Dosis mg/kg	Anzahl Ratten	Ascorbinsäure mg per 100 g Nebenniere	Reduktion in %
Kontrollen	—	16	*413* ± 12*	—
Bienengift.	0,1	8	*381* ± 16	8
„	0,5	8	*296* ± 17	28
„	0,5	8	*303* ± 8**	27
„	1,0	8	*166* ± 8	60
Na-salicylat	100,0	10	*363* ± 17	12
„	200,0	10	*244* ± 17	41
„	400,0	8	*195* ± 11	53

* Die Zahlen in dieser Kolonne bedeuten den Mittelwert und seine mittlere Abweichung.

** Adrenalektomie 3 Std nach der Injektion von Bienengift.

Diskussion.

Die signifikante Herabsetzung der Ascorbinsäure in den Nebennieren, welche nach der Injektion von Bienengift an der intakten Ratte beobachtet werden kann, tritt am hypophysektomierten Tier unter sonst gleichen Bedingungen nicht auf. Daraus muß geschlossen werden, daß die Wirkung des Bienengiftes auf die Nebennieren indirekt über die Hypophyse zustande kommt.

Möglicherweise liegt den Salicylsäure-, Cinchoninsäure- und Pyrazolonderivaten hinsichtlich ihrer Aktivierung der Nebennieren ein anderer Wirkungsmechanismus zugrunde als dem Bienengift. Die antipyretische, analgetische und antidiuretische Wirkung der erstgenannten Stoffe weist auf ihren Angriffspunkt am Zentralnervensystem (Gebiet des Hypothalamus) hin. Die Bedeutung der Kontrolle, welche der Hypothalamus auf die Hypophyse ausübt, zeigen Untersuchungen von Hume (1949) am Menschen. Van Cauwenberge und Betz (1952) und Cronheim et al. (1952) gelangten auf Grund ihrer Untersuchungen an mit Dial bzw. Nembutal narkotisierten Ratten zum Schluß, daß die Wirkung der Salicylate auf das Hypophysen-Nebennieren-System durch direkten Angriff am hypothalamischen Substrat zustande kommt. Für einen ähnlichen neuro-endokrinen Wirkungsmechanismus des Bienengiftes liegen keine Anhaltspunkte vor.

Nach der von Selye entwickelten Stress-Konzeption werden durch jeden Stoff, welcher einen systematischen Stress auszulösen vermag, während der „Alarm-Reaktion" Wirkungen ähnlich denjenigen von ACTH bzw. Cortison entfaltet. Möglicherweise kommen dem Bienengift die Eigenschaften eines Stress auslösenden Agens zu. Die Frage, auf welchem Wege die Aktivierung der Hypophyse zustande kommen

könnte, kann an Hand der bis heute vorliegenden Kenntnisse über die Wirkung des Bienengiftes auf den Organismus nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Immerhin liegen einige Anhaltspunkte auf Grund früherer experimenteller Arbeiten vor. So wies Feldberg (1940) an der Katze nach intravenöser Injektion von Bienengift eine Adrenalinausschüttung nach. Der gleiche Autor wies zusammen mit Kellaway (1937) nach, daß nach Verabreichung von Bienengift in der durchströmten Lunge des Meerschweinchens und des Hundes sowie in der Leber des Hundes Histamin freigesetzt wird. Sowohl Histamin als auch Adrenalin sind in der Lage, die Hypophyse zur Ausschüttung von Corticotropin zu veranlassen. Es ist darum möglich, daß einem oder beiden Stoffen in dem komplexen Wirkungsablauf eine vermittelnde Rolle zukommt.

Ob dieser Mechanismus nach Injektion von Bienengift beim Menschen zum Spielen kommt, ist in Anbetracht der in den Tierversuchen verwendeten hohen Dosen nicht von vorneherein anzunehmen. Der Nachweis einer Aktivitätssteigerung der menschlichen Nebennieren nach therapeutischen Bienengiftdosen könnte hier den positiven Beweis erbringen.

Zusammenfassung.

Die Wirkung von Bienengift auf das Hypophysen-Nebennieren-System wurde an intakten und hypophysektomierten Ratten untersucht. — Bienengift erhöht in den untersuchten Dosen (0,1—1,0 mg/kg i. m.) die sekretorische Aktivität der Nebennieren. Die Wirkung kommt indirekt über die Hypophyse als Vermittler zustande. — Der mögliche Wirkungsmechanismus des Bienengiftes wird diskutiert.

Literatur.

Bertolani, F., R. Lorenzini and B. Bonati: Lancet **1**, 54 (1951). — Blanchard, K. C., E. H. Dearborn, T. H. Maren and E. K. Marshall jr.: Bull. Hopkins Hosp. **86**, 83 (1950). — Cauwenberge, H. van: Lancet **2**, 374 (1951). — Cauwenberge, H. van, and H. Betz: Lancet **1**, 1083 (1952). — Cauwenberge, H. van, and C. Heusghen: C. r. Soc. Biol. Paris **145**, 1272 (1952). — Acta Med. scand. (Stockh.) **141**, 265 (1952). — Champy, C., et M. Demay: Bull. Acad. Med. Paris **135**, 13 (1951). — Cronheim, G., J. S. King and N. Hyder: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 51 (1952). — Feldberg, W.: J. Physiol. **99**, 104 (1940). — Feldberg, W., and C. H. Kellaway: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **15**, 461 (1937). — Hume, D. W. J.: J. Clin. Invest. **28**, 790 (1949). — Lowenthal, J., and L. B. Jaques: J. Pharmacol. **107**, 172 (1953). — Nasmyth, P. A.: J. Physiol. **110**, 294 (1949). — Neumann, W., u. A. Stracke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 8 (1951). — Roe, J. H., and C. A. Kuether: J. of Biol. Chem. **147**, 399 (1943). — Roskam, J., H. van Cauwenberge and A. Mutsers: Lancet **2**, 375 (1951). — Sayers, G., and M. A. Sayers: Recent Progress in Hormone Research **2**, 81 (1948). — Sayers, G., M. A. Sayers, H. L. Lewis and C. H. N. Long: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **55**, 238 (1944).

Dr. H. Weidmann, Kopenhagen-Valby, H. Lundbeck & Co. A/S.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 469—476 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie in Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. F. Hahn).

Beitrag zur Wirkung von Pharmaka auf die Unterdrucktoleranz.

Von

W. Flacke, G. Mülke und R. Schulz.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Juli 1953.)

Auf alle Arbeiten, die sich mit der Wirkung von Pharmaka im Unterdruck oder bei Sauerstoffmangel beschäftigen, soll hier nicht eingegangen werden. Ausgangspunkt unserer Untersuchungen sind lediglich die systematisch angelegten Untersuchungen von Emerson und Mitarbeitern, die eine ganze Reihe von Pharmaka in ihrer Wirkung auf den Tod durch Sauerstoffmangel bei Mäusen untersucht haben. Sie untersuchten Sympathicolytica und Parasympathicomimetica, zentral erregende und zentral lähmende Stoffe. Es ist auf den ersten Blick nicht möglich, die Schutzwirkungen, die sich bei einer Reihe von Substanzen fanden, auf Grund der vorgelegten Ergebnisse auf irgendeinen einheitlichen Nenner zu bringen, zumal innerhalb einer pharmakologischen Gruppe unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Die Autoren erörterten daher verschiedene Möglichkeiten, indem sie Beeinflussungen der Atmung, des Herzens, des Kreislaufs und des Stoffwechsels in Betracht zogen und teilweise — angesichts der Unterschiede innerhalb pharmakologisch zusammengehöriger Gruppen — zu komplexen Vorgängen Zuflucht nahmen.

Im folgenden soll gezeigt werden, daß es durch Registrierung der Körpertemperatur möglich war, einen Faktor herauszuschälen, der offenbar in der Lage ist, die Wirkungen der verschiedenartigsten Stoffe auf einen Nenner zu bringen.

Methodik.

Es wurden weibliche und männliche Mäuse von 10—30 g verwandt. Jeweils eine Maus wurde in einem als Unterdruckkammer dienenden Exsiccator (etwa 2000 cm^3 Rauminhalt) in 6 min bei konstanter Anstiegsgeschwindigkeit auf 180 mm Hg absolut gebracht. Die Überlebenszeit wurde vom Zeitpunkt des Erreichens von 180 mm Hg gerechnet. Wir nannten diese Zeit die „Unterdrucktoleranz".

Die Konzentrationen wurden immer so gewählt, daß nie mehr als 1,0 cm^3 den Mäusen i. p. injiziert zu werden brauchte.

Die Mäuse wurden getrennt in einem Thermostaten konstant bei 24° C gehalten und die Temperaturen mit einem elektrischen Thermoelement gemessen. Die Injektionen erfolgten frühestens nach ½stündigem Aufenthalt im Thermostaten.

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der Körpertemperatur nach Injektion der verschiedenen Medikamente sowie das Verhalten der Unterdrucktoleranz in Form von Mittelwertskurven dargestellt. Die Injektion der Medikamente (bei den Kontrolltieren Kochsalzlösung) erfolgte zur Zeit 0 (auf der Abszisse abgetragen). Die linke Ordinate gibt die Temperaturwerte an, die rechte Ordinate in Minuten die Unterdrucktoleranz. Die Temperaturkurve ist gestrichelt gezeichnet und mit der Streuungsbreite dargestellt (doppelter mittlerer Fehler des Mittelwertes). Die Kurve der Unterdrucktoleranzwerte ist ausgezogen gezeichnet.

Die Temperatur- und Unterdrucktoleranzkurven sind folgendermaßen erhalten worden. Bei einem Teil der Tiere wurde die Veränderung der Körpertemperatur unter dem Einfluß der injizierten Medikamente über mehrere Stunden hin im Thermostaten verfolgt. Ein anderer Teil wurde zu bestimmten Zeiten nach der Injektion, nachdem bis zu diesem Zeitpunkt die Temperatur gemessen war, auf Unterdrucktoleranz geprüft. Für weitere Temperaturmessungen fielen natürlich diese Tiere aus. Die Temperaturwerte sind aber mit in die Temperaturkurven aufgenommen.

Ergebnisse.

Abb. 1 läßt erkennen, daß sich die Körpertemperatur bei den Kontrolltieren nach Injektion von Kochsalzlösung nur wenig verändert. Auch die Unterdrucktoleranz, die zunächst etwas absinkt, bleibt dann lange Zeit konstant. Bei den Kontrolltieren wurde auch der doppelte mittlere Fehler des Mittelwertes berechnet.

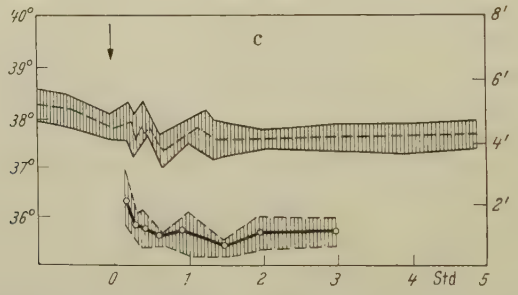


Abb. 1. Kontrolltiere (0,5 cm³ NaCl 0,9% i. p.). Abszisse: Zeit in Stunden. Ordinate rechts: Überlebenszeit (Unterdrucktoleranz) in Minuten. Ordinate links: Körpertemperatur in Grad Celsius. Temperaturmittelwertskurve (gestrichelt) und doppelter mittlerer Fehler (2 ε) des Mittelwerts von mindestens 15 Tieren. Jeder Punkt der Toleranzkurve ist der Mittelwert von 5—28 Tieren. Doppelter mittlerer Fehler gestrichelt.

Abb. 2 läßt erkennen, daß Cardiazol (Penthamethylentetrazol) in nicht krampferzeugenden Dosen die Unterdrucktoleranz beträchtlich erhöht. Die Werte fallen sicher aus dem Streuungsbereich der Kontrolltiere heraus. Gleichzeitig sinkt die Körpertemperatur und erreicht zur Zeit der maximalen Unterdrucktoleranz ihren Tiefpunkt. Der Wiederanstieg der Körpertemperatur fällt zusammen mit dem Rückgang der Unterdrucktoleranz.

Teil b der Abb. 2 zeigt, daß eine Verhinderung des Temperaturabfalls nach Cardiazol durch Überheizung der Tiere eine Erhöhung der Unter-

drucktoleranz nicht in Erscheinung treten läßt. Die Unterdrucktoleranz wurde hier nur zu einem Zeitpunkt, dem Zeitpunkt der maximalen Erhöhung nach Abb. 2a, gemessen. Das gleiche Ergebnis erhielten wir, wenn die durch Cardiazol bewirkte Temperatursenkung durch vorausgehende kleine Gaben von Veronal (Diäthylbarbitursäure) verhindert wurde. Die Veronaldosen erzeugten noch keine Narkose und hatten auf die Körpertemperatur noch keinen Einfluß.

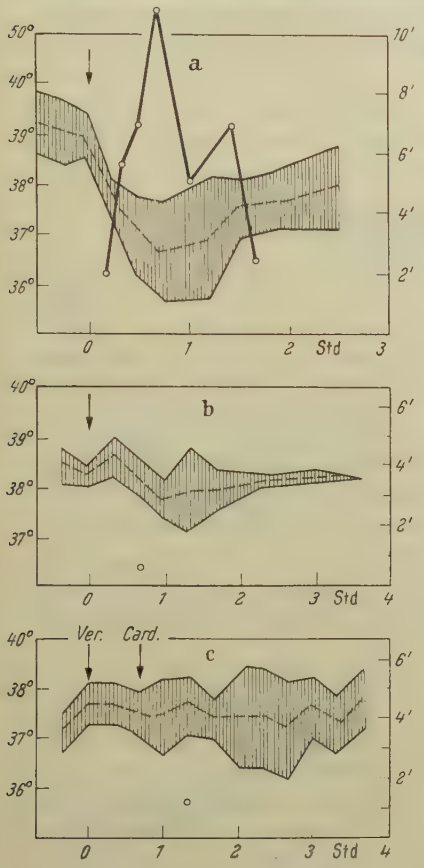


Abb. 2.

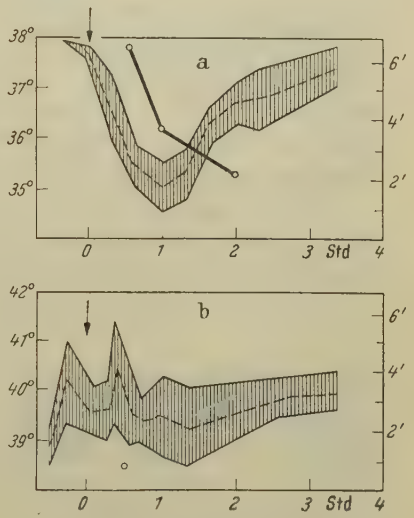


Abb. 3.

Abb. 2. *a* Cardiazol 50 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 6 Tieren. Jeder Punkt der Toleranzkurve ist der Mittelwert von jeweils 5 Tieren. Doppelter mittlerer Fehler des Maximalwertes = 3 min 22 sec. *b* Cardiazol 50 mg/kg i. p. im Wärmekasten (34° C). Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 8 Tieren. Der Toleranzwert ist der Mittelwert von 10 Tieren. $2\,\varepsilon_{tol}$ = 26 sec. *c* Cardiazol 50 mg/kg i. p. 40 min vorher Veronal 40 mg/kg i. p. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 8 Tieren. Der Toleranzwert ist der Mittelwert von 15 Tieren. $2\,\varepsilon_{tol}$ = 1 min 10 sec.

Abb. 3. *a* Pyramidon 150 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 8 Tieren. Jeder Punkt der Toleranzkurve ist der Mittelwert von mindestens 8 Tieren. $2\,\varepsilon_{tol\,1}$ = 2 min 20 sec; $2\,\varepsilon_{tol\,2}$ = 2 min 46 sec. *b* Pyramidon 150 mg/kg i. p. im Wärmekasten (38° C). Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 10 Tieren. Der Wert der Toleranz ist der Mittelwert von 5 Tieren. $2\,\varepsilon_{tol}$ = 28 sec.

Einen stärkeren Temperaturabfall bewirkt das Pyramidon (Aminophenazon) (Abb. 3). Auch hier ist die Unterdrucktoleranz erhöht, wobei aber auffällt, daß das Optimum der Schutzwirkung des Pyramidons

zeitlich vor dem Optimum der Temperaturwirkung liegt. Aber eine Verhinderung der Temperatursenkung durch Überhitzung der Tiere bewirkt auch hier ein Ausbleiben der Toleranzerhöhung (Abb. 3b).

Das Diphenylhydantoin (Abb. 4), das von Hoff und Jahn als Prophylacticum gegen Anoxie im Unterdruck als wirksam gefunden worden

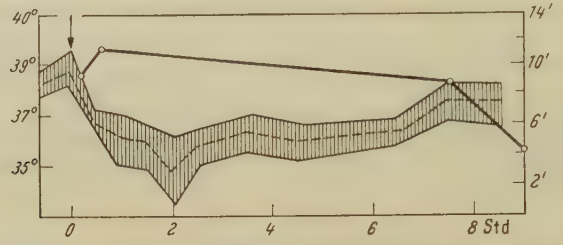


Abb. 4. Diphenylhydantoin (Dilantin) 50 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 8 Tieren. Jeder Punkt der Toleranzkurve ist der Mittelwert von mindestens 5 Tieren. 2 ε_{tol} des Maximalwertes = 3 min 46 sec.

war, erwies sich auch in unseren Versuchen als brauchbares Prophylacticum. Die Wirkung hält hier sehr lange an. Beachtlich ist, daß die Temperatursenkung, die auch hier nicht fehlt, etwa genau so lange anhält.

Abb. 5 zeigt, daß das Pervitin (Phenyl-methyl-aminopropan-chlorhydrat), welches im Gegensatz zu den vorausgehenden Substanzen die Körpertemperatur steigert, keine Toleranzerhöhung bewirkt. Im Gegen-

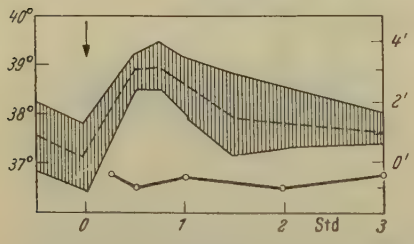
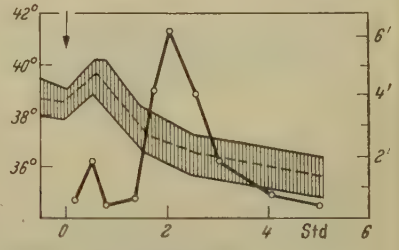


Abb. 5.



Abb, 6.

Abb. 5. Pervitin 5 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 8 Tieren. Jeder Punkt der Toleranzkurve ist der Mittelwert von mindestens 5 Tieren. 2 ε_{tol} = 24 sec.

Abb. 6. Coramin 200 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 8 Tieren. Jeder Punkt der Toleranzkurve ist der Mittelwert von mindestens 5 Tieren. 2 ε_{tol} des Maximalwertes = 5 min 56 sec.

teil, wir finden hier die Toleranz sogar erniedrigt, denn die Werte liegen alle unter 0 sec; das bedeutet, daß die Tiere schon sterben, bevor der für unsere Versuche festgelegte Prüfungsdruck von 180 mm Hg erreicht ist.

Interessant ist das Ergebnis der Versuche mit Coramin (Pyridin-β-carbonsäure-diäthylamid) (Abb. 6). Das Coramin bewirkt zunächst eine

Steigerung der Körpertemperatur, der dann ein Abfall folgt. Die Toleranzerhöhung ist hier zeitlich deutlich verschoben und mit der Phase des Temperaturabfalls zusammenfallend.

Bei unseren Untersuchungen über die Pharmakologie des Chlorophylls* fanden wir eine oxydationshemmende Wirkung. Die Körpertemperatur wurde häufig gesenkt und ein prophylaktischer Effekt gegenüber dem Unterdruck war fast immer vorhanden (vgl. Tabelle). Die Temperatursenkung und Toleranzerhöhung fielen günstiger aus, wenn das Chlorophyll gleichzeitig mit Veronal kombiniert wurde. Hier hat also das Veronal auf Temperatursenkung und Toleranzerhöhung einen fördernden

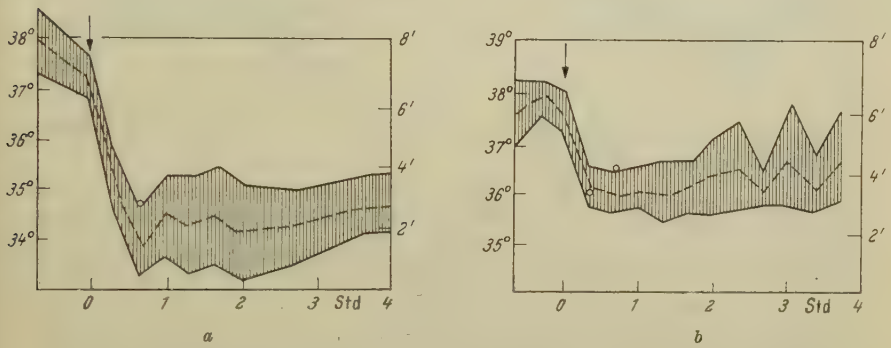


Abb. 7. *a* Äthylalkohol (abs.) 6 cm³/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 10 Tieren. Der Toleranzpunkt ist der Mittelwert von 10 Tieren. 2 ε_{tol} = 30 sec. *b* Äthylalkohol (abs.) 4 cm³/kg i. p. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 10 Tieren. Der Toleranzpunkt ist der Mittelwert von 9 bzw. 13 Tieren, 2 ε_{tol} des Maximalwertes 1 min 26 sec.

Effekt, während es gegenüber Cardiazol auf beide Vorgänge gleichsinnig hemmend wirkt. Dies weist darauf hin, daß die durch Chlorophyll bewirkte Temperatursenkung durch einen anderen Mechanismus bewirkt ist als die Temperatursenkung durch Cardiazol.

Emerson und Mitarbeiter fanden die Schutzwirkung des Äthylalkohols stärker ausgeprägt als vergleichsweise die Schutzwirkung des Luminals. Sie nahmen zu der nicht einleuchtenden Erklärung Zuflucht, daß der Äthylalkohol im Unterdruck als Brennstoff dienen und so den Sauerstoffmangel kompensieren könne. Unsere Versuche zeigen, daß Äthylalkohol (Abb. 7a und b) die Körpertemperatur deutlich stärker senkt als Luminal (Abb. 8) (bei Verwendung der auch von Emerson und Mitarbeitern benutzten Dosen). Die kleinere Äthylalkoholdosis, die die Temperatur weniger senkt, hat allerdings eher eine etwas bessere Schutzwirkung als die stark temperaturerniedrigende höhere Dosis. Aber die Schutzwirkung des Luminals ist vergleichsweise geringer.

* Wir benutzten für unsere Versuche Chlorophyllin „Merck".

Auch Gynergen (Ergotamintartrat) (Abb. 9), das wir in Übereinstimmung mit Emerson und Mitarbeitern als wirksam im Unterdruck fanden, senkt stark die Körpertemperatur.

Von besonderem Interesse war auch die Substanz Megaphen (N-(3'-Dimethylamino)-propylchlorophenothiazin). Auch diese Substanz senkt

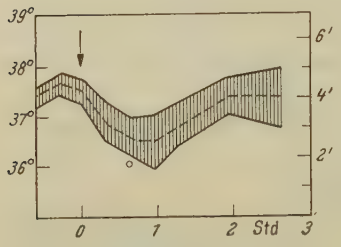


Abb. 8.

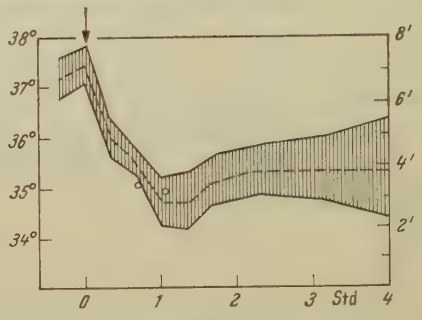


Abb. 9.

Abb. 8. Luminal-Na 50 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 10 Tieren. Der Toleranzwert ist der Mittelwert von 5 Tieren. $2\,\varepsilon_{tol} = 2$ min.

Abb. 9. Gynergen 15 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 10 Tieren. Die beiden Toleranzwerte sind die Mittelwerte von 6 bzw. 5 Tieren. Doppelter mittlerer Fehler $2\,\varepsilon_{tol} = 2$ min.

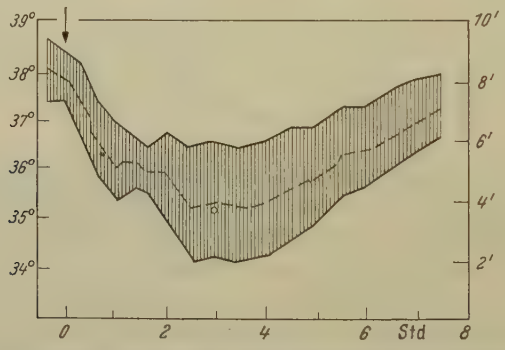


Abb. 10. Megaphen 2,5 mg/kg i. p. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1. Temperaturmittelwertskurve und doppelter mittlerer Fehler von 10 Tieren. Der Toleranzwert ist der Mittelwert von 20 Tieren (zur Kontrolle der mittlere Toleranzwert von 13 unbehandelten Tieren). $2\,\varepsilon_{tol} = 1$ min 36 sec.

anhaltend die Körpertemperatur, weshalb sie klinisch benutzt wird. Auch sie bewirkt eine deutliche Erhöhung der Unterdrucktoleranz (Abb. 10).

Unsere Versuche lassen den Schluß zu, daß die Schutzwirkung sehr verschiedenartiger Stoffe auf Mäuse im Unterdruck, wie sie von Emerson und Mitarbeitern eingehend untersucht worden ist, darauf zurückzuführen ist, daß alle als wirksam gefundenen Substanzen die Körpertemperatur senken. Es handelt sich hierbei um die einfache Auswirkung der van't Hoffschen Regel über die Beziehungen zwischen Stoffwechsel

und Temperatur. Der Zusammenhang wird unterstrichen durch folgende Tatsachen:

1. Substanzen, die die Körpertemperatur steigern (Pervitin oder Coramin in der 1. Phase), erhöhen die Unterdrucktoleranz nicht, können sie eher senken.

2. Eine zeitliche Parallele zwischen Unterdrucktoleranz und Temperatursenkung konnte ebenfalls festgestellt werden.

3. Verhinderung der Temperatursenkung verhindert den prophylaktischen Effekt der Pharmaka.

Es ist möglich, daß es ein Optimum der Temperatursenkung hierbei gibt, bei dessen Überschreitung sich ein ungünstiger Effekt bemerkbar macht. So erklärt sich vielleicht die Tatsache, daß das Optimum der Schutzwirkung bei dem stark temperatursenkenden Pyramidon vor dem Optimum der Temperatursenkung liegt. Auch beim Äthylalkohol war bei der hohen Dosis trotz der starken Temperatursenkung die Erhöhung der Unterdrucktoleranz eher niedriger als bei der kleineren Dosis.

Von der physikalischen Seite her haben wir unsere Ergebnisse ergänzt durch die Beobachtungen von Bunge, wonach durch

Tabelle 1.

1. a) Veronal 40 mg/kg intraperitoneal. Temperaturverhalten nach 80 min.
   b) Veronal 40 mg/kg intraperitoneal. Toleranzwert 80 min nach Injektion.
2. a) Chlorophyllin 40 mg/kg intraperitoneal. Temperaturverhalten nach 40 min.
   b) Chlorophyllin 40 mg/kg intraperitoneal. Toleranzwert 40 min nach Injektion.
3. a) Veronal 40 mg/kg, nach 40 min Chlorophyllin 40 mg/kg intraperetoneal, Temperaturwert nach 40 min.
   b) Veronal 40 mg/kg, nach 40 min Chlorophyllin 40 mg/kg intraperetoneal, Toleranzwert 40 min nach Injektion.

A Mittlere Temperatursenkung in Grad Celsius. *B* Mittlere Toleranzerhöhung in Minuten.

	Anzahl d. Tiere														A	B
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1. a)	+0,1	−0,2	−0,2	−0,4	−0,2	+0,3									−0,1	
b)	1′31″	41″	47″	13″												48″
2. a)	−2,9	−0,6	−0,5	−1,2	−0,1	−1,1	−1,2	−2,7	−1,9	−2,2	−1,1	−0,7	−1,3	−1,0	−1,3	
b)	−17″	13″	−6″	16″	>10′	>10′	4′36″	2′5″	1′50″	42″	1′34″	29″				2′37″
3. a)	−2,8	−1,9	−1,8	−1,2	−2,8	−3,1	−1,9	−1,8	−1,2	−1,2	−2,2	−1,3	−3,6	−2,2	−2,1	
b)	1′12″	1′3″	38″	2′13″	>10′	>10′	>10′	5′2″	1′46″	5′45″	1′41″	1′5″				4′12″

Überhitzung von Mäusen eine Erniedrigung der Höhenkrampfschwelle herbeigeführt wird, sowie von Hall und Cory, welche über eine größere Höhenfestigkeit von Ratten berichteten, die durch äußere Kälteeinwirkung abgekühlt waren.

Man könnte den Einwand machen, daß bekanntlich die Sauerstoffabgabe von Hämoglobin an das Gewebe bei niedriger Temperatur erschwert ist und demnach bei niederer Körpertemperatur eine Anoxie noch verderblicher sein müsse als bei normaler. Dagegen ist jedoch zu sagen, daß die deletäre Situation der Sauerstoffschere nach v. Werz nur dann eintritt, wenn der Körper sich gegen die Kälte wehrt. Für die Temperaturwirkung der Pharmaka ist aber gerade charakteristisch, daß sie den Körper entweder aktiv zur Einstellung auf ein niedrigeres Temperaturniveau veranlassen oder aber durch Lähmung von Zentren oder der Peripherie eine Gegenregulation unmöglich machen. Gerade diese Tatsachen erlangen heute ihre besondere Wichtigkeit auf dem Gebiete der Chirurgie, wo man durch Unterkühlung — sei es durch Kälteeinwirkung oder durch Pharmaka — eine Narkose herbeiführen kann.

Zusammenfassung.

Verschiedene Pharmaka, die gegenüber Sauerstoffmangel im Unterdruck bei Mäusen eine gewisse Schutzwirkung ausüben, wurden auf ihre Temperaturwirkung untersucht. Es ergab sich, daß alle Stoffe, die eine Erhöhung der Unterdrucktoleranz bewirken, die Körpertemperatur senken (Cardiazol, Pyramidon, Coramin, Diphenylhydantoin, Äthylalkohol, Gynergen, Chlorophyll, Megephen), während temperatursteigernde Stoffe (Pervitin) im Unterdruck deletär wirken. Verhindert man die Temperatursenkung bei ersteren, so bleibt auch der prophylaktische Effekt aus.

Erklärt werden diese Befunde mit der Möglichkeit, den Organismus mittels Pharmaka auf ein niederes Temperaturniveau einzustellen oder Gegenregulationen peripherer oder zentraler Natur unmöglich zu machen, so daß er im Sauerstoffmangel länger als normal leben kann.

Literatur.

Anthony, A. J., u. S. Atmer: Luftfahrtmedizin **1**, 185 (1936/37). — Bunge, J.: Luftfahrtmedizin **6**, 127 (1941/42). — Emerson, G. A.: J. of Pharmacol. and Exper. Therap. **76**, 11 (1942). — Emerson, G. A., and E. J. van Liere: Arch. internat. Pharmacodynamie **64**, 139 (1940). — J. Labor. a. Clin. Med. **28**, 689, (1943); **28**, 700 (1943). — Emerson, G. A., E. J. van Liere and J. L. Morrison: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **49**, 376 (1942). — Hall, W. M., and E. C. Corey: Amer. J. Physiol. **160**, 361 (1950). — Hoff, E. C., and Ch. Yahn: Amer. J. Physiol. **141**, 7 (1944). — Lendle, J., u. F. H. Lü: Klin. Wschr. **1935**, 775. — Wäntig, W.: Luftfahrtmedizin **1**, 178 (1936/37). — v. Werz, R.: Die Med. Welt **17** (1951).

Dr. W. Flacke, Pharmakol. Inst. d. Med. Akad. Düsseldorf.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 477—481 (1953).

Aus dem Laboratorium der II. Frauenklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. R. Fikentscher).

Die Standardisierung von Hypophysenhinterlappen-Extrakten am isolierten Rattenuterus.

Von
Kurt Semm.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 13. Juli 1953.)

Zur Bestimmung der uteruswirksamen Komponente eines Hypophysenhinterlappen-Extrakts verwendeten erstmalig Dale und Laidlaw[4] den viriginellen Meerschweinchenuterus. Ihre Methode wurde von anderen Autoren[1, 2, 5, 6, 8, 10, 13, 17, 20] wesentlich verbessert und besonders Burn[3] erarbeitete durch sein „4-Punkt-System" ein exaktes Meßverfahren. Der biologische Fehler der Meerschweinchenmethode wird nach Koll und Kaller[11] noch weiter eingeschränkt, wenn man mit „Endeinstellung in mittlerer Kontraktionshöhe" arbeitet; d. h. mit der Auswertung der Extrakte wird erst begonnen, sobald das Testorgan nach einer einmaligen mittelschwelligen Gabe Oxytocin eine konstante Tonuslage bei regelmäßigen rhythmischen Kontraktionen erreicht hat, was nach ½—2 Std der Fall ist. Letztere Methode erlaubt eine Meßgenauigkeit (Verhältnis von unbekanntem Extrakt: Standardlösung) von $\overset{\times}{:}$ 1,18, gegenüber der von Dale und Laidlaw[4] mit $\overset{\times}{:}$ 1,6.

Alle Autoren bezeichnen die Meerschweinchenmethode als sehr zeitraubend und wegen der Histaminempfindlichkeit des Meerschweinchenuterus in gewissem Sinn als unspezifisch. Bei einem unreinen Extrakt kann der gemessene Wert die Summe der sich addierenden Histamin- und Oxytocin-Wirkung darstellen. Auf der Suche nach einem geeigneteren Testobjekt untersuchte Trendelenburg[21] den Schafsuterus. Die Meßgenauigkeit lag bei $\pm$ 20%. Wie eigene Versuche zeigten, ist der Schafsuterus auch ungeeignet, da sich etwa 40% der präparierten Uterusstreifen nach Versuchsbeginn als unbrauchbar erweisen. Miura[12] verwendete erstmalig zum quantitativen Nachweis des Oxytocins in der Cerebrospinalflüssigkeit den ausgeschnittenen Rattenuterus. Die Meßgenauigkeit war zufriedenstellend, wenngleich der Autor die Meerschweinchenmethode als die genauere bezeichnet. Die Oxytocinaseaktivität des Schwangerenserums konnte Page[14] am Rattenuterus mit $\pm$ 25% Genauigkeit bestimmen. Die Spontankontraktionen versuchte er durch Kastration der Ratte 14—21 Tage vor dem Versuch auszuschalten. Eigenen Versuchen zufolge leidet unter diesem Eingriff die Ansprechbarkeit und somit die Meßgenauigkeit des Uterushornes sehr. Holton[9] übertrug die Methode von Schild[15, 16] auf den Rattenuterus unter Verwendung der von Garcia de Jalon, P. et al.[7] erarbeiteten Erkenntnisse, daß die meisten Rattenuteri keine Spontankontraktionen mehr aufweisen, wenn an Stelle der Tryodelösung die Luckes-Lösung verwendet wird, in der die Calcium- und Glucose-Konzentration auf $^1/_4$ bzw. ½ des üblichen Wertes reduziert ist. Holton[9] suspendierte die Uteri bei 32° C und durchperlte das Suspensionsbad mit einem Gemisch von 95% O_2 + 5% CO_2. Die durchschnittlich gegebene Einzeldosis war 0,4 intern. Einheiten Oxytocin. Die Standardisierungszeit für eine unbekannte Lösung wird mit $3^3/_4$ Std angegeben.

E. Werle, K. Semm und R. Enzenbach[18] verwendeten bei ihren Versuchen, die Oxytocinase im Schwangerenserum näher zu charakterisieren, stets den Rattenuterus. E. Werle und K. Semm[19] geben für die Meßgenauigkeit von Oxytocin am Rattenuterus $\pm 5\%$ an.

Versuchsteil.

Zu den Standardisierungen von Hypophysenhinterlappen-Extrakten wurden weiße weibliche Ratten im Gewicht von > 120 g verwendet. Am besten eignen sich Tiere 3—4 Wochen nach ihrem ersten Wurf, oder ganz

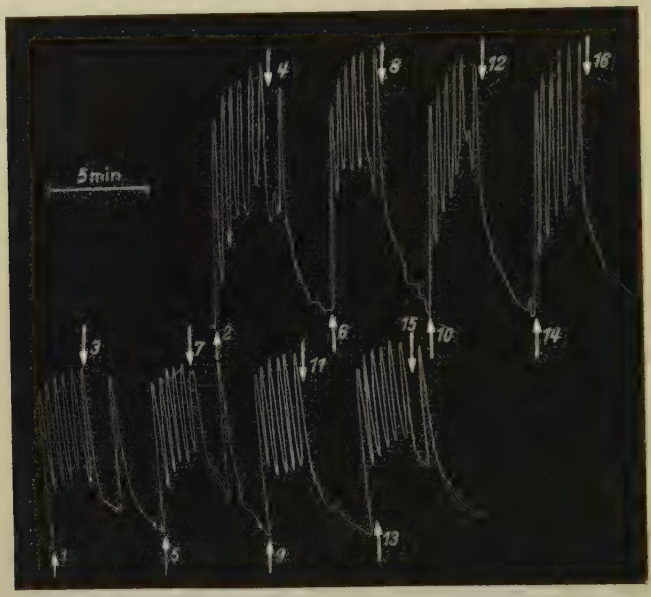


Abb. 1. Zwei isolierte Rattenuterushörner (je 2,5 cm lang) je in 12,5 ml Tyrodelösung bei 37° C suspendiert. Hebelübertragung 1:8. Pfeil 1, 2, 13, 14: je 0,5 ml (= 0,01 int. Einh. Oxytocin) der Standardlösung; bei 5: 0,85 ml; 6: 0,90 ml; 9: 0,825 ml; 10: 0,875 ml des unbekannten Extrakts Spülung bei 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 und 16.

alte Tiere, die nicht mehr trächtig werden. Bei einiger Erfahrung kann jedoch alles anfallende Tiermaterial verwendet werden. Gravide Uteri sind unbrauchbar, ein häufig beobachteter Hydrops Uteri vermindert die Ansprechbarkeit der Organe nicht. Stets wurde nur der vaginale Anteil meist beider Uterushörner verwendet, da dieser wesentlich weniger Spontankontraktionen aufweist als das Ganzpräparat oder der Ovar nahe Anteil.

Meßmethode. Durch Verdünnen einer auf internationale Einheiten eingestellten konzentrierten Lösung wird eine Standard-Lösung bereitet, die pro ml Tyrodelösung 0,02 int. Einh. Oxytocin enthält. Davon 0,5 ml auf das Badvolumen 12,5 ml ist für 95% des verwendeten Tiermaterials die

Dosis, die zu Kontraktionen von etwa 2 Drittel der jeweiligen Maximalkontraktionen führt. Bei geringen Dosen erschlafft das Uterushorn nach jeder Einzelkontraktion wieder völlig, während bei zu hohen Dosen die rhythmischen Kontraktionen in tetanische übergehen; das Kurvenbild ähnelt dann dem, das der Meerschweinchenuterus zeichnet und ist für Oxytocinmessungen unbrauchbar. Nach 2 min rhythmischer Kontraktionen wird das Bad mehrmals erneuert und dem Uterus 3 min Erschlaffungs- und Erholungszeit gegeben; darnach erfolgt die neue Oxytocingabe. Nach 1—2 Std verschwinden die Spontankontraktionen meist völlig, hierdurch wird das Kurvenbild übersichtlicher.

Auswertung des Kurvenbildes. Für die Messung ist die Höhe der über der Ruhelinie liegenden unteren Kontraktionszacken der Größe der jeweiligen Oxytocin-Dosis direkt proportional. Bleiben diese Zacken manchmal nicht in gleicher Höhe, so ist der Abfall bei gleichen Oxytocingaben derselbe und die Kurvenbilder kongruent.

Beispiel einer Auswertung. Dem frisch eingehängten Uteruspaar werden 2 bis 3mal hintereinander je 0,5 ml mit 0,01 int. Einh. Standard verabreicht. Vom unbekannten Hypophysenhinterlappen-Extrakt gibt man 0,5 ml aus einer Verdünnungsreihe. Durch die Spritzreihenfolge: Standard-2mal unbekannte Lösung-Standard pendelt man sich auf die Menge der unbekannten Lösung ein, die eine der Standardkurve identische zeichnet. Die Standardisierung einer unbekannten Lösung nimmt etwa 1½ Std in Anspruch; mit einem Uteruspaar können bis zu 5 unbekannte Extrakte in 4—6 Std eingestellt werden (Abb. 1).

Meßgenauigkeit. Bisher wurden Doppelpräparate von 800 weißen Ratten untersucht. Bei allen Versuchen waren die unteren Fußpunkte der jeweiligen Oxytocin-Konzentration proportional. Eine Spontankontraktion, bei der sich der Uterus mehrere Male nicht bis zur Ruhelinie erschlaffte wurde selten beobachtet und durch Inkongruenz mit dem zweiten Horn sofort erkannt.

150 Testserien, zu denen die zu testende Oxytocinlösung jeweils von fremder Hand* bereitet wurde, zeigten folgende Genauigkeit (siehe auch Tab. 1).

Von jeder Serie wurde der arithmetische Mittelwert errechnet und nach Formel $100 : y_m = x : y_b$** die übrigen Werte prozentualisiert. Alle Testserien wurden somit auf gleichen Nenner gebracht und aus ihren Variationen (x_1, x_2, $x_3 \ldots x_i$) und Häufigkeit (y_1, $y_2 \ldots y_i$) unter Berücksichtigung des Umfanges der Verteilung (N = Zahl der Einzelbestimmungen) der arithmetische Mittelwert errechnet: $m = \frac{x_i y_i}{N} = 99{,}0$. Die Streuung nach Formel: $\sigma = \sqrt{\frac{x_i (x_i - m)^2}{N-1}}$ betrug 3,02. Der mittlere Fehler des Mittelwertes und der Streuung an Hand von $f m \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0{,}29$

* Für die Überlassung von Oxytocin und Herstellung der Verdünnungen danke ich der Fa. Hormon-Chemie, München.

** y_m = arithm. Mittelwert der Meßgruppe, y_b = jeweiliger Meßwert, x = auf 100 bezogener Wert y_b.

und $f\sigma = \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = 0{,}20$. Die Fehlergrenze des Mittelwertes $(m - 3fm,\ m + 3fm)$ war $\pm\ 3fm = 0{,}88$.

Verunreinigungen des Hypophysenhinterlappenextrakts mit Histamin stören die Messungen nicht, wenn sie < 1—$2\,\gamma$ pro Oxytocin-Gabe sind. Größere Mengen (z. B. $10\,\gamma$) führen zu einer Verminderung der

Tabelle 1. *Darstellung von 5 Meßreihen. Testorgan isolierter Rattenuterus.*

Versuchs-Nummer	Verdünnung des Konzentrats	Gefundener Wert	Verdünnung × gefundener Wert	Arithmetischer Mittelwert	Abweichung prozentualisiert
1	1/20	5,47	109		101,6
	1/15	7,06	106	107,3	98,7
	1/11	9,70	107		98,8
2	1/10	2,61	26,1		99,1
	1/12	2,20	26,4		100,2
	1/12	2,12	25,4	26,34	96,4
	1/14	1,96	27,4		104,0
	1/9	2,93	26,4		100,2
3	1/10	10,9	109		100,9
	1/10	10,6	106	108	89,1
	1/1	109,0	109		100,9
4	1/8	2,79	22,3		97,2
	1/10	2,35	22,5	22,94	103,4
	1/7,6	3,05	23,48		102,3
	1/7,6	2,96	22,5		98,1
5	1,10	4,6	46,0		104,8
	1/20	2,13	42,6		97,0
	185/2000	4,2	45,4		103,4
	185/2000	4,16	45,0	43,9	102,5
	1/4	11,4	45,6		98,8
	1/20	2,17	43,4		97,9
	74/1000	3,17	43,0		104,1
					$m = 99{,}5$; $\sigma = 2{,}14$; $3mf = 1{,}37$.

Ansprechbarkeit des Rattenuterus auf Oxytocin. Wird dem Uterus während seiner rhythmischen Kontraktionen Histamin in hohen Dosen verabreicht, vermindert sich die Kontraktionshöhe sofort bedeutend; eine völlige Desensibilisierung des Rattenuterus auf Oxytocin ist jedoch auch durch größte Histamin-Dosen ($1500\,\gamma$) nicht möglich.

Zusammenfassung.

Die Brauchbarkeit des Rattenuterus zur Standardisierung von Oxytocin wurde untersucht. Der Rattenuterus spricht auf Oxytocin rasch an; es wird die Entfernung der unteren Zacke während der rhythmischen

Kontraktionsphase von der Ruhelinie gemessen und diese auf Gleichheit mit einem Standard gestellt. Etwaiger geringer Histamingehalt der Versuchslösung hat auf die Oxytocinmessung am Rattenuterus keinen störenden Einfluß. Eine Messung dauert durchschnittlich 1½ Std; mit einem Uterushorn kann bis zu 8 Std gearbeitet werden. Die Streuung der beschriebenen Methode wird aus einer Meßreihe mit großem Umfang zu (σ) 3,02 errechnet.

Literatur.

[1] Bachinsky, W. M., M. G. Allmark and Morell: Canad. J. of Research **23/E**, 126 (1945). — [2] Bliss, C.: Ind. Engl. Chem. **12**, 84. Quated by S. A. Thaler (1946) Vitamins and Hormones **4**, 318. — [3] Burn, J. H.: Biol. Auswertemethoden. Berlin: Springer 1937. — [4] Dale, H. H., and Laidlaw: J. of Pharmacol. **4**, 75 (1912). — [5] Finney, D. J.: J. of Hyg. **45**, 397 (1947). — [6] Gaddum, J. H.: Quart. J. Pharm. **11**, 697 (1938). — [7] Garcia de Jalon, P., J. Bayo Bayo and M. Garcia de Jalon: Farmacoterapia Actual **11**, 313 (1945). — [8] Hamburger: Acta Pharmacol. a. Toxicol. **1**, 112 (1945). — [9] Holton, P.: Brit. J. of Pharmacol. **2**, 189 (1948). — [10] Knaffl-Lenz, E.: Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Abtl. IV, Teil 7 B, S. 1521 (1925). — [11] Koll, W., u. H. Kaller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 133 (1952). — [12] Miura, Y.: Pflügers Arch. **207**, 76 (1925). — [13] Morell, C. A., M. G. Allmark and W. M. Bachinsky: J. of Pharmacol. **70**, 440 (1940). — [14] Page, E. W. M. D.: San Francisco, Calif. Univers. Calif., Abtl. Geb.-Hilf. und Gynäkol. Medical School (1947). — [15] Schild, H. O.: J. of Physiol. **101**, 115 (1942). — [16] Schild, H. O.: Brit. J. of Pharmacol. **2**, 189 (1947). — [17] Smith, R. B. jr., and B. J. Vos jr.: J. of Pharmacol. **78**, 72 (1934). — [18] Werle, E., K. Semm u. R. Enzenbach: Arch. f. Gynäkol. **177**, 211 (1950). — [19] Werle, E., u. K. Semm: Klin. Wschr. **1951**, 31/32, 544. — [20] Thompson, R. E.: J. of Pharmacol. **80**, 373 (1944). — [21] Trendelenburg, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **138**, 301 (1928).

Dr. Kurt Semm, II. Frauenklinik d. Univ. München.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 482—489 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für medizinische Forschung und Fortbildung Gießen (Direktor: Professor Dr. F. Hildebrandt).

Pharmakologische Untersuchungen über das Glykosidgemisch aus Boviea volubilis.

Von

F. Hildebrandt und E. Paas.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. Juli 1953.)

In dem in Südafrika beheimateten Zwiebelgewächs Boviea volubilis Harvey haben wohl als erste Jaretzky und Scheermesser stark wirksame Glykoside nachgewiesen und isoliert. In neueren Untersuchungen hat Katz aus den Zwiebeln drei herzaktive Glykoside dargestellt, die er als Bovosid A, B und C bezeichnet. Als Toxizitätswerte dieser Reinsubstanzen werden für A 5, für B 4 und für C 3,7 mg als Katzeneinheit angeführt. In der Größenordnung entspricht ihre Toxizität demnach der des Ouabains mit 5,6 mg für 1 Katzeneinheit.

Ein Rohglykosid aus Boviea, das von Prof. Schenck, Berlin, stammte, war bereits im Jahr 1943 in meinem Institut auf seine Herzwirkungen untersucht worden (Bornmann). Bei der Auswertung hatte dieses Rohglykosid einen Wert von 987000 FD/g ergeben. Ein später ebenfalls von Herrn Schenck übersandtes weitgereinigtes Bovieaglykosid A zeigte einen Wirkungstiter von 1,7 Millionen Meerschweincheneinheiten/g. Die von Jahn durchgeführten Untersuchungen ergaben analoge Resultate zu den früheren Untersuchungen von Bornmann.

Zu den jetzigen Versuchen stand mir das Gesamtglykosidgemisch zur Verfügung, das alle drei Bovieaglykoside von Katz enthält. In dankenswerter Weise wurde es mir von den Chem. Fabr. Knoll A.G. zu pharmakologischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Es stellt ein lockeres hellbraunes Pulver dar, das sich gut in niederen Alkoholen, in verdünntem Äthylalkohol und in Aceton, schwer in Essigester löst. Sein Titer bei der Auswertung nach Knaffl-Lenz liegt bei 0,045 mg/100 g Meerschweinchen, entsprechend 2,2 Millionen ME/g.

Nach den bekannten Untersuchungen von W. Straub über die Zeit/Menge-Beziehungen bei der Auswertung herzwirksamer Glykoside am Meerschweinchen gibt es für jedes Glykosid ein Optimum der Infusionsgeschwindigkeit und der Konzentration. Aus diesen beiden Faktoren können nach W. Straub Schlüsse auf die Bindungsgeschwindigkeit der Glykoside gezogen werden. Wir haben mit dem Bovieaglykosidgemisch derartige Versuche angestellt (Hildebrandt und Paas) und

dabei den Minimaltiter von 0,045 mg/100 g Meerschweinchen + 0,01 bei einer Konzentration von 1:10000 und einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,0165 mg/kg/min festgestellt. Bei höherem Giftangebot (Konzentration 1:1500 und 1:5000 mit den Infusionsgeschwindigkeiten von 0,1 bzw. 0,033 mg/kg/min) lagen die Titer bei 0,058 bzw. 0,052. Bei niedrigerem Giftangebot (Konzentration 1:20000 und Infusionsgeschwindigkeit 0,0084) betrug die tödliche Dosis 0,053 mg. Aus den verhältnismäßig geringen Differenzen der Titer kann auf einen schnellen Wirkungseintritt, also eine schnelle Bindungsgeschwindigkeit geschlossen werden.

Herzwirkung.

Vergleichende Untersuchungen des jetzt zur Verfügung stehenden Glykosidgemisches mit dem früher untersuchten Rohglykosid (Bornmann) am isolierten Froschherzen ergaben die typische Digitaliswirkung mit tonischem Herzstillstand bei Konzentrationen zwischen 1:10000 und 1:500000 (Jahn). Auch am Froschherzen ist entsprechend der schnellen Wirkungsgeschwindigkeit, die wir bei der Titerfestsetzung fanden, die Wirkungsgeschwindigkeit eine außergewöhnlich rasche. Die Vergiftung tritt doppelt so schnell ein als nach Digitoxin und übertrifft auch noch die des Strophanthins.Was die Reversibilität betrifft, so ist die einmal eingetretene Fixation des Glykosids sehr stark ausgeprägt, denn auch bei Konzentrationen von 1:500000 — die durchschnittliche Zeit bis zum systolischen Stillstand beträgt hier 15 min 20 sec — ist der systolische Endzustand nicht auswaschbar.

Als Aufbrauchdosis wurde nach den bekannten Passage-Versuchen von W. Straub 0,98 γ/100 mg Temporarienherz gefunden, was etwa der Dosis, die von Issekutz für Digitoxin (Merck) (0,75 γ) gefunden wurde, entspricht.

Mit dem Rohglykosid hatte Bornmann eine Konzentrationserhöhung in der Herzmuskelzelle gegenüber der Konzentration der Giftlösung auf das 12—13fache gefunden. Mit dem jetzigen Bovieaglykosidgemisch war die Speicherung noch erheblich stärker, da das Giftkonzentrationsverhältnis Herz zu Kanülenflüssigkeit auf das Verhältnis 54: 1 anstieg.

Bekanntlich bestehen erhebliche Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der Glykoside der Digitalisreihe bezüglich ihrer Fähigkeit, an das Eiweiß des Serums (Albuminfraktion) gebunden zu werden. So wird Strophanthin praktisch nicht, Digitoxin dagegen fast quantitativ gebunden (Hoekstra, Suter, Lendle). In dieser Beziehung steht das Bovieaglykosidgemisch in der Mitte, denn die Konzentration, die in Serum innerhalb von 7—11 min das isolierte Froschherz zum tonischen Stillstand führt — diese Konzentration wird ja in den Versuchen jeweils aufgesucht — beträgt 1:75000, während in Ringer-Lösung schon die halbe Konzentration, also 1:150000 genügt (Detzel). Es werden also rund 50% des Glykosids am Albumin entweder adsorptiv (Hoekstra) oder an Nebenvalenzen des Eiweißes (Lendle) gebunden.

Hier möchte ich die Anschauung vertreten, daß mit dieser Bindung an Eiweiß die langdauernde Wirkung eines Glykosids zusammenhängt, indem dieser Komplex eine gewisse Depotwirkung bedingt. Das nicht an das Albumin gebundene Bovieaglykosid kommt schnell zur Wirkung, daher auch der außergewöhnlich rasche Wirkungseintritt der Vergiftung, während der gebundene Teil des Glykosids allmählich vom Serum wieder abgegeben wird und damit die protrahierte Wirkung hervorruft.

Versuche am Herz-Lungen-Präparat ergaben auch wieder die typische Digitaliswirkung, die besonders deutlich in Erscheinung tritt, wenn das Herz durch das alle Teilfunktionen schädigende Chinidin in den Zustand der Insuffizienz gebracht wird. Als typisches Beispiel sei ein derartiger Versuch angeführt:

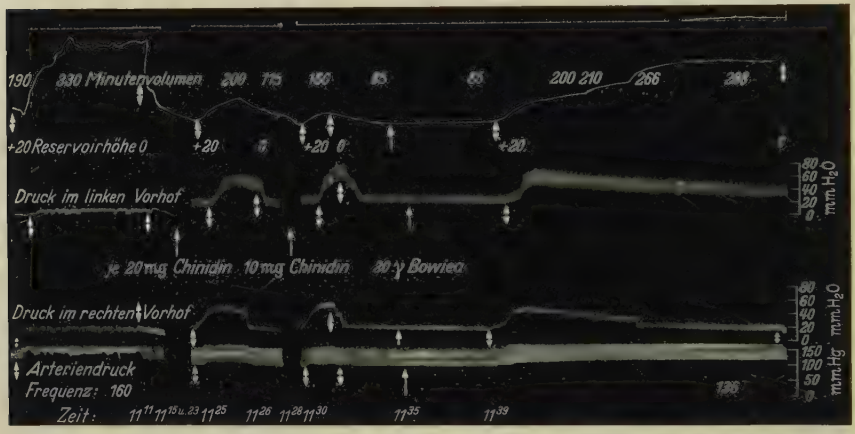


Abb. 1. Oberste Kurve: Minutenvolumen, darunter Druck im linken Vorhof, dann Druck im rechten Vorhof, darunter Arteriendruck (Beschreibung im Text).

Auf dem ersten Kurvenabschnitt ist die Leistungsfähigkeit des Herzens zunächst in der üblichen Weise nach P. Trendelenburg durch Steigerung des venösen Zuflusses (Erhöhung des Blutreservoirs um 20 cm) geprüft. Bei dieser Belastung steigt das Minutenvolumen von 190 auf 330, während die Drucke in den beiden Vorhöfen nur die minimale Erhöhung um einige Millimeter aufweisen. Nach drei hintereinanderfolgenden Gaben von je 20 mg Chinidin in das Reservoir wird das Herz deutlich insuffizient, denn das Minutenvolumen steigt bei der gleichen Belastung jetzt nur mehr auf 200 cm³, während gleichzeitig die Vorhofdrucke stark pathologisch ansteigen. Nach Senkung des Reservoirs auf die Ausgangshöhe geht das Minutenvolumen auf 115 cm³ zurück und die Vorhofsdrucke sinken wieder annähernd auf normale Werte. Nach einer nochmaligen Gabe von 10 mg Chinidin ist die Insuffizienz noch stärker geworden, denn das Minutenvolumen steigt bei der Belastung jetzt nur noch auf 160 cm³ und die Vorhofdrucke schnellen sofort in die Höhe. Nach Senkung des Reservoirs geht das Minutenvolumen auf 85 cm³ zurück. Jetzt werden 20 γ Bovieaglykosidgemisch in das Reservoir gegeben, ihre Wirkung kommt nach einigen Minuten zur Geltung. Bei der gleichen Belastung wie früher steigt nunmehr das Minutenvolumen auf 200 und nach etwa 10 min sogar auf 288 cm³ an. Auch die Drucke in den Vorhöfen, die bei der Belastung zunächst angestiegen waren, gehen

im Verlauf der nächsten 10 min stetig herunter, um schließlich praktisch normale Werte zu erreichen. Das Herz ist also wieder voll suffizient geworden.

In einer ganzen Reihe von Versuchen am Herz-Lungen-Präparat, die durchweg im gleichen Sinne verliefen (insgesamt 7), haben wir als therapeutisch wirksame Dosis 20—30 γ Bovieaglykosid festgelegt. Toxische Erscheinungen — sie wurden dadurch hervorgerufen, daß von Zeit zu Zeit kleine bis mittlere Mengen (20—100 γ) Glykosid zugesetzt wurden — traten dann auf, wenn etwa die 3—4fache Menge dieser therapeutischen Dosis auf das Herz einwirkte. Es traten dann Irregularitäten, vor allem Extrasystolen, auf. Bei Steigerung auf das doppelte dieser toxischen Dosis kam es dann im Zeitraum von rund $\frac{1}{4}$ Std zum Stillstand des Herzens.

Im EKG, am Herz-Lungen-Präparat aufgenommen, tritt nach einer ersten Gabe von 30—50 γ Boviea eine mäßige Bradykardie mit Verlangsamung der Überleitungszeit auf. Nach Erhöhung der Dosen auf insgesamt 0,1 mg Boviea zeigen sich Störungen der Erregungsausbreitung im Ventrikel und nach einer weiteren Erhöhung der Dosis auf jetzt insgesamt 0,2 mg kommt es zu atrioventrikulären und ventrikulären Extrasystolen und starken Überleitungsstörungen; anschließend Kammerautomatie und wenige Minuten später plötzlicher Herzstillstand.

Glykosidverbrauch der einzelnen Organe.

Vergleicht man die Hatcher-Dosis am intakten Hund mit der tödlichen Dosis am eviscerierten Tier und zieht man dabei die effektiv tödliche Herzdosis, die man am Herz-Lungen-Präparat festgestellt hat, ab, so kann man daraus nach Rothlin (1) den auf die einzelnen Organe entfallenden Glykosidanteil rechnerisch erfassen. Die Durchschnittswerte von 2 gut übereinstimmenden Versuchen am Hund ergeben folgende Werte:

Tabelle 1.

	100%		
	Herz	Viscera	Eviscceriertes Tier minus Herz
Glykosidverbrauch %	10	55	35
% Körpergewicht	0,7	14	85
Relativer Verbrauch pro Gewichtseinheit	40	12,3	1

Der auf das Herz entfallende Glykosidanteil in Höhe von 10% entspricht etwa der auf das Coronarsystem entfallenden Blutmenge. Es wird also bei der langsamen Infusion nach Hatcher das gesamte angebotene Glykosid sofort vom Herzen gebunden, was bei der hohen Bindungs-

geschwindigkeit des Bovieaglykosids zu erwarten ist. Pro Gewichtseinheit nimmt das Herz 40mal so viel Glykosid auf wie die Organe, die nach der Evisceration übrig bleiben, also Muskulatur, Haut, Blut, Lungen, Gehirn und Skelet. Die Eingeweide binden 12% mehr als die Organe des eviscerierten Tieres. Damit ist auch für dieses Glykosid eine echte Speicherungsfähigkeit des Herzens erwiesen.

Tödliche Dosen.

Bei intravenöser Infusion ergaben sich für die verschiedenen Tiere folgende tödliche Dosen:

Meerschweinchen	0,45 mg/kg
Katze	0,246 mg/kg
Hund	0,304 mg/kg.

Die subkutan tödliche Dosis für das Meerschweinchen beträgt 0,03 mg/100 g. Sie liegt somit ein Drittel niedriger als die intravenös tödliche Dosis. Diese Differenz ist aber auch bei anderen Glykosiden festzustellen, denn wir haben die Erfahrung gemacht, daß der Tod bei Tieren auch eintreten kann, wenn man nur zwei Drittel der intravenös tödlichen Dosis zur Infusion bringt und dann noch eine zeitlang wartet. Toxische Erscheinungen am Herzen treten ja praktisch bei allen Glykosiden dann auf, wenn etwa das Doppelte der therapeutischen Dosis infundiert ist. Sie sind aber offenbar noch bis zu einem gewissen Grade rückbildungsfähig, denn die Störungen können im Verlauf von einer Anzahl von Stunden wieder zurückgehen. Werden aber höhere Dosen, also etwa zwei Drittel der intravenös letalen Infusionsdosis verabreicht, so sind sie irreversibel und der Tod tritt innerhalb der nächsten Stunden oder auch Tage ein, was ja bereits Bauer und Fromherz in eingehenden Versuchen festgestellt haben.

Die peroral letale Dosis haben wir an einer Serie von Meerschweinchen ermittelt. Allerdings ist das Meerschweinchen als Pflanzenfresser kein sehr geeignetes Versuchsobjekt, denn Hotovy stellte fest, daß bei diesem Tier im Vergleich zu Katzen, bei denen Digitoxin praktisch zu 100% resorbiert wird, das Glykosid nur mangelhaft zur Resorption gelangt.

Tab. 2 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen.

In 3 Versuchen haben wir die Resorption des Glykosidgemischs bei peroraler Gabe am Hund geprüft: Bei der 10fach intravenösen letalen Dosis starb ein Tier bereits nach 35 min, ein weiteres nach 120 min. Bei der 5fachen Dosis Exitus nach 6 Std; bei der 3fach letalen war das Tier nach 24 Std noch nicht tot, es wurde daher eine „Auffülldosis" gegeben. Sie betrug 14% der intravenös letalen Dosis.

Aus diesen Versuchen am Hund geht hervor, daß nach mehreren Stunden bereits mindestens 20% des in den Magen gegebenen Glykosidgemisches zur Resorption gelangt sein müssen. Da auch bei der 3fach

letalen Dosis nach 24 Std nur eine geringe „Auffülldosis" in Höhe von 14% der intravenös letalen Dosis notwendig ist, ist bis zu dieser Zeit ungefähr ein Drittel zur Resorption gelangt, wobei aber zu berücksichtigen ist, daß innerhalb dieser 24 Std sicher schon ein nicht unerheblicher Teil des Glykosids entgiftet wurde. Außerdem wurde ja das Glykosid

Tabelle 2.

x fache der i. v. let. Dosis	Ergebnis
13 fach	1. Tier nach 41 min tot; 2. Tier nach 125 min tot.
6,5 fach	1. Tier nach 3 Std tot; 2. Tier nach 6 Std tot.
3,2 fach	1. Tier nach 7 Std tot; 2. Tier nach 12 Std tot.
2 fach	Zwei Tiere einige Stunden lang vergiftet, aber Erholung.
1,3 fach	Zwei Tiere einige Stunden vergiftet, aber volle Erholung innerhalb 3 Tg.

nicht etwa in den Darm injiziert, sondern in den Magen gegeben, und sicher werden dabei nicht unerhebliche Mengen an den Mageninhalt adsorbiert, eine teilweise Zerstörung ist allerdings auch nicht ausgeschlossen. Trotzdem kann man mit Sicherheit sagen, daß das Glykosidgemisch auch vom Magen-Darmkanal aus eine gute Wirkung ausübt, denn auch die Versuche am Meerschweinchen mit seinen äußerst ungünstigen Resorptionsverhältnissen bei dieser Applikationsart sprechen durchaus für eine sehr gute Resorbierbarkeit.

Kumulation.

Die Frage der toxischen Kumulation haben wir sowohl am Meerschweinchen als auch an der Taube (Brechdosis nach HANZLIK) geprüft. Das Resultat am Meerschweinchen findet sich in der folgenden Tabelle:

Tabelle 3.

Prozent der s. c. let. Dosis	Tot nach wieviel Tagen bei täglicher Injektion dieser Dosis
75	1. Tier 1 Std nach der 2. Injektion tot, also am 2. Tag; 2. Tier 1 Std nach der 3. Injektion tot, also am 3. Tag.
66	1. Tier 14 Std nach der 3. Injektion am 3. Tag tot; 2. Tier 2 Std nach der 4. Injektion (4. Tag) tot.
50	Ein Tier nach 4 Injektionstagen, zwei Tiere nach 5 Injektionen (5 Tage) und ein 4. Tier nach 5 Injektionen am 6. Tag gestorben.

Das Bovieaglykosidgemisch zeigt also eine langdauernde Wirkung, die sich bei entsprechend hohen täglichen Dosen in deutlicher toxischer Kumulation äußert.

In den Brechversuchen an der Taube (Hildebrandt u. Reinartz) zeigten sich ebenfalls deutliche Erscheinungen der toxischen Kumulation doch waren dieselben entschieden bedeutend weniger stark ausgeprägt als bei Digitoxin.

In einigen Versuchen haben wir auch die Nachhaltigkeit der Wirkung des subkutan beigebrachten Glykosidgemisches am Meerschweinchen untersucht, und zwar in der Form, daß wir ein Drittel der subkutan letalen Dosis gaben und nach einer Pause von 6–24 Std „auffüllten".

Auffülldosis nach x Stunden	Auffülldosis in Prozent der i. v. let. Dosis
6	100
	122
12	130
	137
24	100
	81

Nach 12 Std ergibt sich demnach eine beachtliche Resistenzsteigerung, wie sie von uns früher (1) und ebenso von Rothlin (2) für die Digitalisglykoside festgestellt worden ist. Nach 24 Std ist diese Änderung der Reaktionsbereitschaft aber abgeklungen, es wird dann nur noch die gewöhnliche letale Dosis benötigt.

Die Prüfung auf diuretische Eigenschaften ergab, daß in einer gewissen Dosierung, die etwa 4% der intravenösen letalen Dosis betrug, das Glykosidgemisch eine leichte, eben noch nachweisbare Steigerung der Diurese hervorrief (Versuche von Sterz am Meerschweinchen).

Zusammenfassung.

Das aus Bovica volubilis dargestellte Glykosidgemisch zeigt am isolierten Froschherzen und am Herz-Lungen-Präparat des Hundes typische Digitaliswirkung. Durch Dosen von 20—50 γ werden durch Chinidin hervorgerufene Insuffizienzerscheinungen beseitigt. Die toxische Dosis für das Herz, festgestellt am Herz-Lungen-Präparat, liegt bei 100 bis 150 γ pro Herz. Am EKG treten Reizleitungsstörungen, Extrasystolen und partieller bis totaler Block auf. Die tödliche Dosis für das Herz beträgt 200 γ.

Pro Gewichtseinheit verbraucht das Herz das 40fache an Glykosid gegenüber der Muskulatur.

Für Katze, Hund und Meerschweinchen werden die tödlichen Dosen bei verschiedener Applikationsart angegeben.

Die kardiotonische Wirkung tritt schnell ein, und zwar mindestens so schnell wie nach Strophanthin. Die Wirkung ist nachhaltig, denn bei entsprechend hohen Dosen kommt es zur toxischen Kumulation der Wirkung.

Literatur.

Bauer u. Fromherz: Klin. Wschr. **1933**, 973. — Bornmann: Arch. Kreisl.-forsch. **13**. 369 (1944). — Detzel: Dissertation, Gießen (1953). — Haarmann, Hagemeier u. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **194**, 205 (1940). — Hildebrandt: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 662 (1947); **205**, 210 (1948). — Hildebrandt u. Paas: Arzneimittelforsch. **2**, 274 (1953). — Hildebrandt u. Reinartz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — Hoekstra: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 649 (1931). — Hotovy: Arzneimittelforsch. **1**, 160 (1951). — v. Issekutz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **78**, 155 (1915). — Jahn: Dissertation, Gießen (1951). — Jaretzky: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **273**, 334 (1935). — Katz: Helvet. chim. Acta **33**, 1420 (1950). — Rothlin: (1) Proc. Virchow Med. Soc. New York **6**, 74 (1947). — (2) Helvet. Physiol. et Pharmacol. Acta **5**, 298 (1947). — Scheermesser: Dissertation, Braunschweig (1936). — Sterz: Dissertation, Gießen (1953). — Straub, W.: Arch. Exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 189 (1941); **199**, 427 (1942). — Suter: Helvet. Physiol. et Pharmacol. Acta **2**, 211 (1944).

Prof. Dr. F. Hildebrandt, Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 490—502 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung und Fortbildung der Justus Liebig-Hochschule Gießen
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Hildebrandt).

Fehlermöglichkeiten bei der Durchblutungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach H. Rein.

Von
J. Dörner.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Juli 1953.)

Die zunehmende Verbreitung der Thermostromuhrmethode nach Rein läßt es angebracht und gerechtfertigt erscheinen, über einige Fehlermöglichkeiten bei ihrer Anwendung im Tierexperiment zu berichten, deren Nichtbeachtung oder Unkenntnis zu fehlerhafter Interpretation der erhaltenen Kurven nicht nur in quantitativer, sondern auch in qualitativer Hinsicht führt.

Von Rein selbst wurde auf den störenden Einfluß von Venenklappen hingewiesen und die Möglichkeiten der Erkennung dadurch verursachter oder andersartig bedingter schlechter Elementlagen aufgezeigt. Cerletti und Rothlin nahmen eingehend zu methodischen Fragen der Durchströmungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr Stellung, wobei sie im wesentlichen Ergebnisse von Modellversuchen berücksichtigten. Neuerdings wurden von Dunker und Köhrmann und von Schmidt und Boguth einige Probleme der Thermostromuhrmessung behandelt, die mit unserer Themenstellung direkt nicht in Zusammenhang stehen.

Die im folgenden aufgezeigten Fehlerquellen bei in vivo-Versuchen beschränken sich auf solche, die bei einwandfreier Elementlage auftraten. Die Möglichkeit einer Feststellung derartiger Störungen ergab sich uns auf Grund von annähernd 100 Tierversuchen, bei denen jedesmal die Durchblutungsänderung der Hinterextremitäten ein- oder beidseitig an A. oder V.fem. oder beiden Gefäßen zusammen nach Injektion von Adrenalin und Arterenol registriert wurde. Die dabei gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen erlaubten uns, Abweichungen von der typischen Reaktionsweise nach Injektion beider Substanzen zu erkennen und sie in den meisten Fällen auf quantitativ oder qualitativ falsche Elementreaktionen zurückzuführen. Die Befunde wurden einige Monate vor seinem Tod Herrn Prof. Rein vorgelegt und mit ihm diskutiert, wobei sie seine Zustimmung fanden.

Methodik.

Versuchstiere waren Hunde im Gewicht von 8—15 kg in Polamidon-Pernocton-Narkose. Atmung meist spontan durch Trachealkanüle.

Registrierung der Hinterextremitätendurchblutung wie in der Einleitung angegeben. Teilweise waren die Hautgefäße unterbunden oder die Extremität enthäutet. Zur Verwendung kamen nur Thermoelemente vom Typ A und N, die in einer Stromrichtung mindestens 4—5mal an verschiedenen Tagen und verschiedenen Venen geeicht worden waren, dabei brauchbare Exponenten ergeben hatten und auf Grund unserer Eicherfahrungen als zuverlässig angesehen werden konnten. Insgesamt wurden in fast 1jähriger Vorarbeit Methode und Elemente in annähernd 300 Modelleichungen auf ihre Zuverlässigkeit geprüft. Über die dabei gewonnenen Ergebnisse soll später berichtet werden. Quantitative Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte unter Berechnung der Relativänderungen, d. h. die Ausgangsdurchblutung wurde immer gleich 100% gesetzt. War eine derartige quantitative Auswertung wegen der Elementeigenschaften oder aus anderen Gründen nicht möglich, so wurde lediglich die Richtung der Durchblutungsänderung berücksichtigt.

Blutdruckmessung in der A. brachialis. Injektion von Adrenalin und Arterenol in physiologischer und nahezu physiologischer Dosierung i.v. oder lokal i.a. Injektionsgeschwindigkeit immer $^1/_2$ min. Nachstehende Beobachtungen stützen sich auf eine Auswertung von rund 1000 Injektionen.

Die hauptsächlichsten Kriterien für eine falsche Elementreaktion waren: 1. abweichendes Verhalten von den typischen Durchblutungsänderungen nach Injektion beider Substanzen; 2. unterschiedliches Verhalten von Arterien- und Venendurchblutung oder der Durchblutung der beiden Hinterextremitäten; 3. Durchblutungssteigerungen von geradezu unvorstellbarem Ausmaß; 4. Vergleich mit Gefäßreaktionen auf andere Reize von bekannter Wirkungsqualität; 5. Berücksichtigung der Form der Durchblutungskurve. Zur Charakterisierung einer Durchblutungsänderung als qualitativ falsch wurden immer mehrere obiger Kriterien herangezogen.

Ergebnisse.

1. Die wichtigste Fehlerquelle ist mit der Messung der Durchblutung in Arterien verbunden, wenn letztere sich auf physiologische oder pharmakologische Reize hin kontrahieren. Während eine Konstriktion des arteriellen Strombettes meist mit einer Durchblutungsabnahme verbunden ist, das Galvanometer in unserem Falle also einen größeren Ausschlag zeigt, kann es unter dieser Bedingung sehr oft zu einer Inversion des Galvanometerausschlages in Richtung der Elementnullinie kommen, also scheinbar eine Mehrdurchblutung registriert werden, ohne daß eine solche vorliegt. Es soll dabei abgesehen werden von den Fällen, bei denen eine solche Störung auch für den weniger Geübten ohne weiteres ersichtlich ist, wie der entsprechende Ausschlag des Elementes an der A.fem.d. der Abb. 1 nach i. v. Injektion von 1 γ/kg Adrenalin zeigt. Hier ergibt sich allein aus der Verlaufsform und dem spitzwinkeligen Ansatz des sekundären Ausschlages in Richtung der Elementnullinie, daß dieser Reaktionsausfall nicht reell sein kann. (Der primäre, schraffiert gezeichnete Ausschlag entspricht dagegen einer echten Durchblutungszunahme und ist typisch für die i. v. Injektion.) Schwieriger, wenn nicht unmöglich, wird schon die Erkennung der gleichen Störung aus dem Kurvenverlauf der A.fem.sin. der Abb. 1, wobei hier allerdings ein Element von Typ N verwendet wurde (siehe unter 2.).

Abb. 2 *A* zeigt die Durchblutungsänderungen der A.fem.d. (nur Muskeldurchblutung) und A.fem.sin. nach Injektion von 0,1 γ/kg Arterenol in den unteren Abschnitt der Aorta abd. Während es bei dieser Injektionsart nach Arterenol immer zu einer Durchblutungsabnahme der Hinterextremität kommt, auch wenn nur die Muskeldurchblutung gemessen wird, verzeichnet das Element an der A.fem.d. einen Ausschlag in Richtung der Elementnullinie, der nicht so leicht als qualitativ falsch

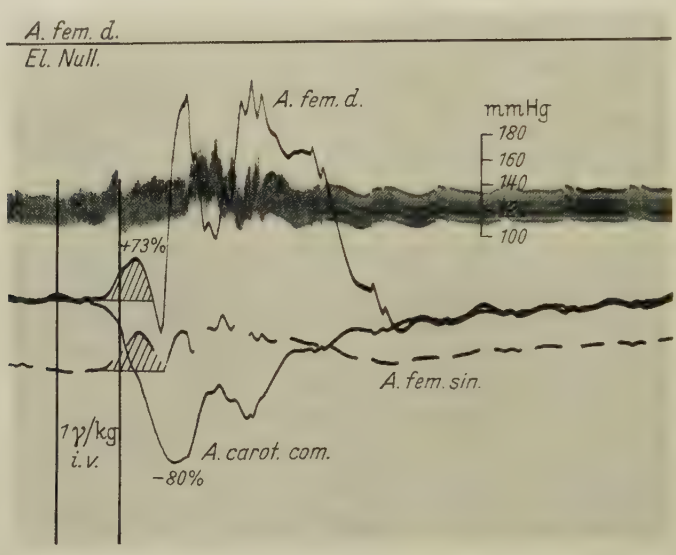


Abb. 1. Hund 8,0 kg. Qualitativ falsch angezeigte Durchblutungsänderung der A. fem. d. und A. fem. sin. nach i. v. Injektion von 1 γ/kg Adrenalin: der primäre, schraffiert gezeichnete Ausschlag entspricht einer echten Durchblutungszunahme, der sekundäre Ausschlag zur Elementnullinie hin ist richtungsmäßig falsch (siehe Text). Die obere durchgezogene Linie stellt die Verbindung der Elementnullinie zu Anfang und zu Ende des Versuchsabschnittes dar (gilt auch für alle folgenden Abbildungen). Zeitmarkierung der unterbrochenen Kurve in allen Abbildungen 20 sec. A.fem.d.: Elem.Typ A, x = 0,52; A.fem.sin.: Elem.Typ N, x = 0,21; A. carotis com.: Elem.Typ A, x = 0,43.

erkannt werden kann. Die Reaktion des Elementes an der A.fem.sin. ist ähnlich. Anschließende Injektion einer höheren Dosis Arterenol (Abb. 2 *B*) führte zu denselben Veränderungen, die jetzt stärker ausgeprägt und auch an der A.fem.sin. deutlicher zu erkennen sind. Bei letzterer reicht der Ausschlag fast bis an die Elementnullinie heran, ein Zeichen für sich allein, daß es sich um eine falsche Wiedergabe der Durchblutungsänderung handelt. Auch läßt schon die Form des Ausschlages beider Elemente an der Echtheit der Reaktion stark zweifeln. Zu beachten ist, daß an beiden Gefäßen kein deutlicher primärer Ausschlag in entgegengesetzter Richtung zur Elementnullinie vorhanden ist, der eine Minderdurchblutung anzeigen und die Diagnose erleichtern würde. Dagegen findet

sich besonders an der Kurve der A.fem.d. terminal ein spitzwinkelig verlaufender Ausschlag in Richtung Minderdurchblutung, der bei Übergängen von echten Mehrdurchblutungen in Durchblutungsabnahmen in dieser Form nicht gesehen wird (vgl. z. B. die Kurve der V.fem.d. der Abb. 4 und der V.fem.sin. der Abb. 6).

Können bei Kenntnis solcher Fehlermöglichkeiten derartige Reaktionsabläufe noch mehr oder weniger gut erkannt werden, so ist dies bei der Pseudoreaktion der A.fem.sin. der Abb. 3 *A* nicht mehr der Fall. Das

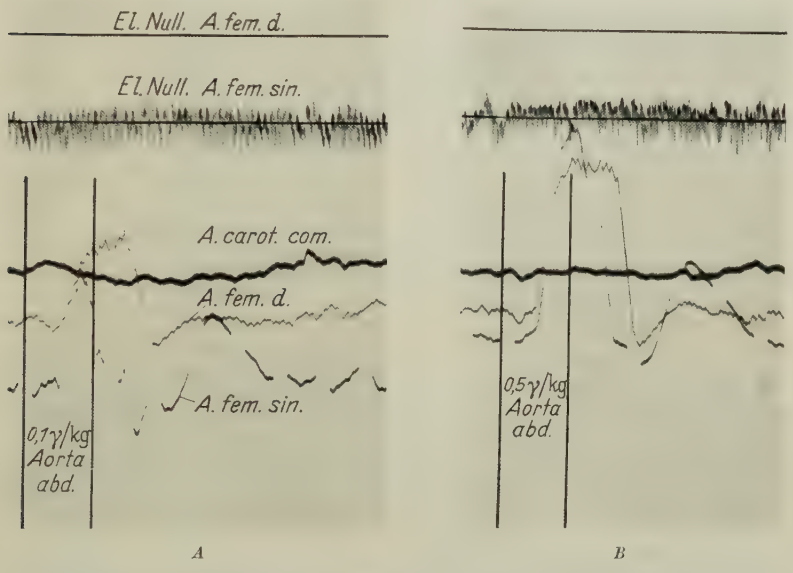
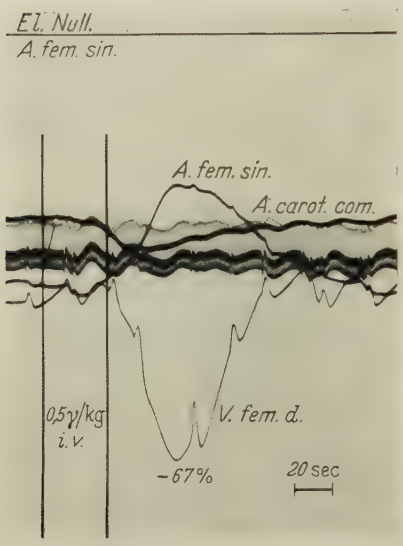


Abb. 2. Hund 9,9 kg. Qualitativ falsch angezeigte Durchblutungsänderung der A.fem.d. (nur Muskeldurchblutung) und A.fem.sin. nach Injektion von 0,1 γ/kg Arterenol (*A*) und 0,5 γ/kg Arterenol (*B*) in die Aorta abd. oberhalb der Teilung. Es handelt sich in beiden Fällen um Durchblutungsabnahmen (siehe Text). A.fem.d.: Elem.Typ A, x = 0,52; A.fem.sin.: Elem.-Typ A. x = 0,43.

Element an der A.fem.sin. zeigt hier nach i. v. Injektion von 0,5 γ/kg Adrenalin eine in keiner Weise auffallende und durchaus reell erscheinende Mehrdurchblutung von 160% an, während an der V.fem. der anderen Extremität eine starke Minderdurchblutung registriert wurde, ein zunächst überraschendes und nicht ohne weiteres zu erklärendes Verhalten. Durchblutungskurven von A.fem.sin. und V.fem.d. verlaufen fast spiegelbildlich. Bei Erhöhung der Dosis auf 3 γ/kg Adrenalin wurde der Reaktionsverlauf der Abb. 3 *B* erhalten. Man sieht nun, wie bei stärkster Minderdurchblutung in der V.fem.d. der Ausschlag des Elementes an der A.fem.sin. bis fast an die Elementnullinie heranreicht, so daß es nicht schwer

ist, die Unechtheit der angezeigten Durchblutungsreaktion zu erkennen. Auch hier kein primärer Ausschlag in Richtung einer Minderdurchblutung. Bei später erfolgter teilweiser Entblutung zeigte sich ebenfalls ein Ausschlag in Richtung der Elementnullinie, so daß es nicht zweifelhaft sein kann, daß es sich bei der Reaktion der A.fem.sin. in Abb. 3 *A* ebenfalls um eine qualitativ falsch angezeigte Reaktion handelt, die in Wirklichkeit als Minderdurchblutung gewertet werden müßte, wobei jedoch selbstverständlich in allen diesen Fällen auf eine Auswertung verzichtet wird. Aus dem Kurvenverlauf als solchem ist die Pseudoreaktion in keiner Weise zu erkennen.



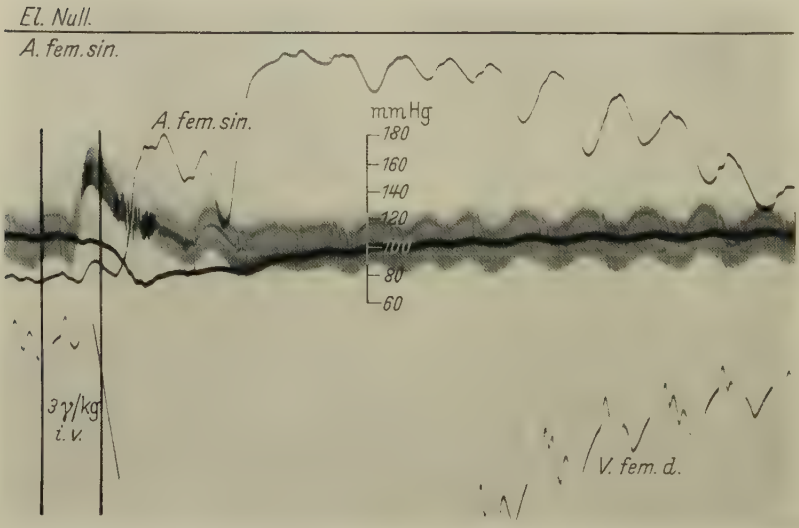


Abb. 3. Hund 13,5 kg. Qualitativ falsch angezeigte Durchblutungsänderung der A.fem.sin. nach i. v. Injektion von 0,5 γ/kg Adrenalin (*A*) und 3 γ/kg Adrenalin (*B*). Während aus der Abb. *A* die falsche Reaktionsweise des Elementes an der A.fem.sin. nicht zu erkennen ist, geht sie aus der Abb. *B* bei Verwendung der höheren Dosis eindeutig hervor (siehe Text). Die V.fem.d. zeigt in beiden Fällen starke Durchblutungseinschränkung. A.fem.sin.: Elem.Typ A, x = 0,52; V.fem.d.: Elem.Typ N, x = 0,41; A. carotis com.: Elem.Typ A, x = 0,3—0,48.

Abb. 4 gibt schließlich eine Reaktion wieder, bei der die Durchblutung der Hinterextremitätenmuskulatur, gemessen an den Vv.fem.d. et sin., nach i. v. Injektion von 0,5 γ/kg Arterenol fast gleichartig verläuft. Die Durchblutung der A.fem.d. nimmt mit der venösen Durchblutung ebenfalls zu, um dann bei Rückgang der Durchblutung in beiden Vv.fem. vorübergehend noch stärker anzusteigen, ohne später den Ausgangswert wieder zu erreichen. Während der auch in der venösen Durch-

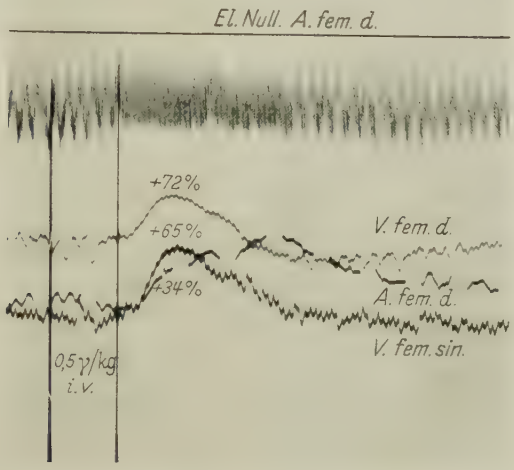


Abb. 4. Hund 13,6 kg. Durchblutungsänderungen der Vv.fem.d. et sin. und A.fem.d. (unterbrochene Kurve) nach i. v. Injektion von 0,5 γ/kg Arterenol. Die scheinbare Durchblutungszunahme der A.fem.d. während des Rückgangs der Mehrdurchblutung in den Vv.fem.d. et sin. ist nicht reell (siehe Text). A.fem.d.: Elem.Typ. A, x = 0,52; V.fem.d.: Elem.Typ N, x = 0,35; V.fem.sin.: Elem.Typ A, x = 0,57.

blutung zum Ausdruck kommende Durchblutungsanstieg einen typischen Adrenalin- und Arterenoleffekt darstellt (vgl. auch den primären Durchblutungsanstieg in Abb. 1), handelt es sich bei der weiteren scheinbaren Durchblutungszunahme in der A.fem.d. während des Rückgangs der Durchblutung in den Vv.fem. um eine Pseudoreaktion und damit um eine nicht mehr verwertbare Durchblutungsanzeige. Allein aus dem Kurvenverlauf ist die falsche Reaktion nicht zu erkennen. Jedoch bestätigten im Laufe des Versuches ausgeführte lokale i. a. Injektionen von Veratrin und Adrenalin, daß das Element an der A.fem.d. auf Reize, die zur Durchblutungsabnahme führen, mit einem Ausschlag in Richtung der Elementnullinie reagiert.

Diese Beispiele, die beliebig fortgesetzt werden könnten, machen deutlich, welchen Täuschungen man in der Bewertung von Durchblutungskurven unterliegen kann, wenn an Arterien gemessen wird und

eine Arterienkontraktion nicht sicher auszuschließen ist. Sie zeigen zugleich die große Mannigfaltigkeit in den Verlaufsformen solcher Fehlreaktionen, die eine Beurteilung äußerst erschwert. Aus den Abbildungen einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß mit solchen Fehlermöglichkeiten nicht immer gerechnet wurde. Man sollte es daher nie unterlassen, bei Messung der Durchblutung in Arterien gleichzeitig die venöse Durchströmung mit zu registrieren. Denn nur auf diese Weise kann man sich vor unliebsamen Irrtümern schützen. Selbstverständlich brauchen arterielle und venöse Durchblutung wegen der Reaktion des Capillargefäßgebietes nicht parallel zu gehen.

Obige Fehlerquelle beobachteten wir sehr häufig bei Messung der Durchblutung an den Aa.fem., nicht dagegen oder nur selten an der A.carotis com., A.carotis int., A.mesent.sup., A.renalis, A.lienalis und soweit eine Beurteilung möglich ist, auch nicht an der A.coronaria. Kuschke und Westermann stellten in unserem Institut die gleiche Störung an der A.fem. nach Injektion von Peripherin fest. Aus der Abb. 3 *a* ihrer Arbeit ist ohne weiteres zu ersehen, daß die Reaktion an der A.fem. nicht reell sein kann, während die Abb. 3 *b* einen arteriellen Durchblutungsverlauf zeigt, dessen Unechtheit ohne Kenntnis der Reaktion 3 *a* und der venösen Durchblutung nicht zu erkennen wäre.

Die Ursache ist zweifellos in einer Gefäßkontraktion zu suchen, die zu einem unter Umständen nur sehr geringen Abheben der Gefäßwand von den Heizelektroden oder den Thermolötstellen führen kann. Versuche, bei denen das Gefäß unter ovaler Verformung fest in die Gefäßrinne des Elementes eingeklemmt wurde und bei denen diese Störungen ebenfalls auftraten, machen es wahrscheinlich, daß in erster Linie ein Abheben des Gefäßes von den Thermolötstellen verantwortlich zu machen ist. Die Folge ist eine Verminderung der Temperaturdifferenz zwischen den beiden Thermolötstellen und damit ein Ausschlag des Galvanometers in Richtung der Elementnullinie. Intensität und Form dieses Ausschlages sind weitgehend von zufälligen Bedingungen abhängig. Ein Durchströmungsstillstand als Ursache dieser Störungen ist bei allen unseren Versuchen auszuschließen.

2. Vergleichende Untersuchungen an Arterien (Aa.fem.), bei denen die Durchblutung gleichzeitig mit einem Element vom Typ A (alter Typ) und Typ N (neuer Typ) gemessen wurde, ergaben, daß die Elemente vom Typ N zur Durchströmungsmessung an Arterien nicht brauchbar sind. Die mit diesen Elementen erhaltenen Durchblutungskurven wichen oft nicht nur in quantitativer, sondern teilweise auch in qualitativer Hinsicht von den mit dem Typ A registrierten Durchblutungskurven und von der venösen Durchblutung ab. (Die unter 1. aufgezeigten Störungen beziehen sich demgegenüber sämtlich auf die Verwendung des Types A, wie aus den Legenden zu den Abbildungen zu entnehmen ist.) Nach einer persönlichen

Mitteilung von Rein wurde der Typ N nur zur Verwendung an Venen geschaffen und seine Benutzung an Arterien von Rein als Kunstfehler bezeichnet. Leider ist diese Tatsache nicht allgemein bekannt. Vielfach wird dem Typ N wegen seiner besseren thermoisolatorischen Eigenschaften generell der Vorzug gegeben, wie aus dem Schrifttum zu entnehmen ist, auch wenn es sich um Durchströmungsmessungen an Arterien handelt. In den meisten Fällen aber wird auf eine Angabe des Elementtypes ganz verzichtet, so daß im Einzelfall nicht festzustellen ist, inwieweit die Voraussetzungen einer arteriellen Durchblutungsmessung gegeben waren.

Neben der Unbrauchbarkeit des Elementtypes N an Arterien haben unsere Modell- und in vivo-Versuche ergeben, daß mit dem Elementtyp A eine höhere Ausbeute an brauchbaren Elementen und meist auch eine bessere Konstanz der Werte zu erhalten ist.

3. Wie schon von Cerletti und Rothlin erwähnt, kann es vorkommen, daß im Tierexperiment bei Durchblutungssteigerungen der Galvanometerausschlag bis nahe an die Elementnullinie zurückgeht. Die quantitative Auswertung unter Übertragung der von den Modelleichungen her bekannten Charakteristik des Elementes ergibt in diesen Fällen Durchblutungssteigerungen von unvorstellbarem Ausmaß. In Abb. 5 ist ein Beispiel für eine derartig starke Durchblutungsänderung nach i. v. Injektion von 0,5 γ/kg Arterenol wiedergegeben. Legt man in diesem Falle zur Auswertung der Durchblutungszunahme der V.fem. einen in fünf Eichungen ermittelten Exponenten von x = 0,41 für das Element an der V.fem. zugrunde, so resultiert eine Zunahme der Durchströmung von über 7000%. Die Unmöglichkeit eines solchen Verhaltens liegt auf der Hand. Es handelt sich hier um eine typische, primäre Durchblutungszunahme nach i. v. Injektion von Arterenol, die in ihrem Ausmaß von dem Element nicht richtig wiedergegeben ist. Diese quantitativ falschen Angaben stehen in keinem Zusammenhang mit den unter 1. erwähnten qualitativ falschen Elementreaktionen an Arterien.

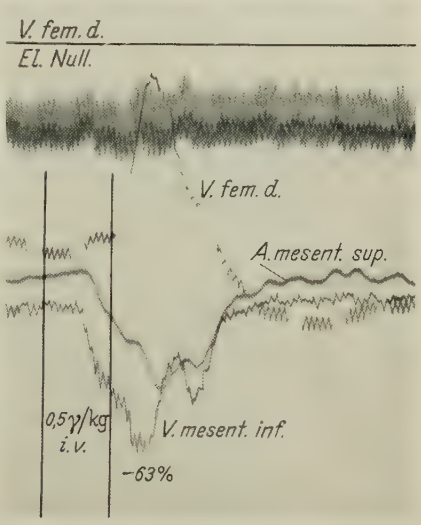


Abb. 5. Hund 14,9 kg. Quantitativ falsch wiedergegebene Durchblutungssteigerung der V.fem.d. nach i.v. Injektion von 0,5 γ/kg Arterenol. Die Auswertung würde eine Zunahme der Durchblutung von über 7000% ergeben (siehe Text). V.fem.d.: Elem.Typ N, x = 0,41; A.mesent.sup.: Elem.Typ A, x = 0,43; V.mesent.inf.: Elem.Typ A, x = 0,5.

Insbesondere zeigt der Verlauf der Durchblutungskurve niemals irgendwelche Anormalitäten, die auf eine Störung der Beziehungen zwischen Gefäß und Element schließen lassen könnten. Die Ursache ist in einer Änderung der Elementcharakteristik zu sehen und von Cerletti und Rothlin diskutiert worden. Auch in Modelleichversuchen konnten wir dieses Verhalten öfters feststellen.

Bei quantitativer Auswertung eines Versuches unter Angabe der relativen Durchströmungsänderungen können derartige Störungen verhältnismäßig leicht erkannt werden, wenn die Stärke der Durchblutungssteigerung, wie in Abb. 5, jedes vernünftige Ausmaß überschreitet. Schwieriger wird eine Beurteilung in den Fällen, in denen die Zunahme der Durchblutung derart ist, daß sie noch als reell angesehen werden kann. Ob und inwieweit bei den in normalen Grenzen sich bewegenden Meßresultaten solchen Fehlermöglichkeiten ebenfalls eine Bedeutung zukommt, entzieht sich vorläufig unserer Kenntnis. Von den Modelleichungen her können wir sagen, daß eine Änderung der Elementcharakteristik meist erst dann einsetzt, wenn eine bestimmte Durchströmungsgeschwindigkeit überschritten wird (siehe auch Cerletti und Rothlin). Wird, wie so häufig, auf quantitative Angaben verzichtet, so spielt diese Reaktionsstörung keine große Rolle. In diesen Fällen ist es aber auch unmöglich, irgendwelche Rückschlüsse aus der Stärke des Galvanometerausschlages auf das Ausmaß der Durchblutungsänderung zu ziehen.

4. Nicht immer ist es möglich, eine offensichtliche Fehlreaktion in der bisherigen Weise einzuordnen. Dies soll in Abb. 6 an der Durchblutungskurve der V.fem.d., bei der die Hautäste unterbunden sind, nach i. v. Injektion von 3 γ/kg Adrenalin demonstriert werden. Die Durchblutungssteigerung, der eine kleine negative Zacke vorausgeht, ist entweder lediglich in ihrem Ausmaß nicht richtig wiedergegeben, oder es liegt eine qualitativ falsche Durchblutungsanzeige vor. In letzterem Falle wäre zu berücksichtigen, daß es sich um eine venöse Durchblutungsmessung handelt und daher der Störung eine andere Ursache zugrunde liegen müßte als bei den unter 1. genannten Fällen. Eine Entscheidung ist uns nicht möglich. Wichtig ist, daß solche Störungen, die nicht immer in dieser relativ auffallenden Weise aufzutreten brauchen, erkannt und von der Auswertung ausgeschlossen werden. Es kommt immer wieder vor, daß man Reaktionen verzeichnet, denen man aus dem einen oder anderen Grunde skeptisch gegenüber treten muß. Im Zweifelsfalle sollte man auf eine Auswertung verzichten.

5. Nicht selten ist zu beobachten, daß eine Durchblutungskurve im Laufe des Versuches während einer gewissen Zeit sich langsam und meist kontinuierlich in Richtung einer Mehr- oder Minderdurchblutung bewegt, ohne daß dieser Änderung in der Durchblutungskurve eine echte Durch-

blutungsänderung zugrunde liegen würde, wie aus vergleichenden Untersuchungen hervorgeht. Solches Verhalten sahen wir meist nur bei bestimmten Elementen, während andere diese Störung nicht oder weniger zeigten. Eine Beziehung zu der in Modelleichungen festgestellten Güte des Elementes war dabei nicht zu erheben. Ursächlich scheint uns eine Absonderung von Gewebsflüssigkeit dafür verantwortlich zu sein, wenn sie mit der Zeit das Element allseitig umgibt. Ähnliche Veränderungen der

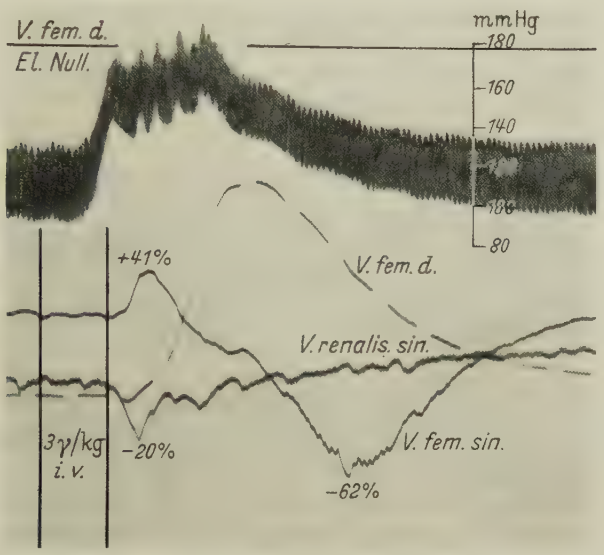


Abb. 6. Hund 7,2 kg. Nach i. v. Injektion von 3 γ/kg Adrenalin Fehlreaktion des Elementes an der V.fem.d., wobei die Natur der zugrunde liegenden Störung unklar bleibt (siehe Text). V.fem.d.: Elem.Typ N, x = 0,22 − 0,34; V.fem.sin.: Elem.Typ A, x = 0,5; V.renalis sin.: Elem.Typ A, x = 0,43.

Durchblutungskurve kommen aber auch als Folge tatsächlicher spontaner Durchblutungsänderungen vor, wie sie sich im Verlaufe eines Versuches immer wieder ereignen können. Eine Unterscheidung dieser echten Durchblutungsschwankungen von den Pseudoreaktionen ist teilweise recht schwierig, wenn nicht unmöglich.

Neben diesen nicht mehr auf das Ausgangsvolumen zurückkehrenden Änderungen der Durchblutungskurve kann es auch zum Auftreten spontaner Reaktionen kommen, die sich bald schnell, bald langsamer wieder auf die Ausgangsdurchblutung einstellen. Diesen vorübergehenden Spontanreaktionen liegen zu einem Teil echte Durchblutungsänderungen zugrunde; in anderen Fällen aber handelt es sich um Pseudoreaktionen, hervorgerufen durch irgendwelche meist nicht zu ermittelnde Einflüsse auf das Element. An den Extremitäten z. B. kann eine kleine Bewegung

genügen, um das Element vorübergehend geringfügig aus seiner Lage zu bringen. Die Unterscheidung auch dieser Pseudoreaktionen von den echten Reaktionen ist oft problematisch.

Alle diese unter 5. erwähnten spontanen Änderungen der Durchblutungskurve, seien sie nun reell oder nicht, verpflichten dazu, besonders bei der Beurteilung protrahiert verlaufender Reaktionen, wie sie z. B. nach Injektion länger wirkender Pharmaka zu erwarten sind, äußerst zurückhaltend und kritisch zu sein. Gerade hier wird eine größere Zahl von Versuchen notwendig, will man zu brauchbaren Ergebnissen gelangen. Vor allen Dingen sollte man sich lange genug über den Verlauf der Ruhedurchblutungskurve orientieren. Die vorteilhafteste Anwendungsmöglichkeit der Thermostromuhrmethode liegt in der Beobachtung kurzdauernder Reaktionsabläufe.

6. Daß man mit dem Beginn einer Injektion solange warten muß, bis der Ausschlag nach Aufheizen des Blutes seinen vollen Wert erreicht hat, was unter Umständen einige Minuten dauern kann, sollte selbstverständlich sein. Verschiedene Veröffentlichungen der letzten Zeit, bei denen darauf keine Rücksicht genommen und die erhaltenen Kurven fehlerhaft ausgewertet wurden, geben Veranlassung, darauf hinzuweisen.

Schlußbemerkungen.

Vorstehende Ausführungen zeigen, daß die Reinsche Methode der Durchströmungsmessung mit einer Reihe von Fehlermöglichkeiten behaftet ist, ohne deren Kenntnis man in der Interpretation der erhaltenen Kurven großen Täuschungen unterliegen kann. Leider ist aus dem Schrifttum zu entnehmen, daß die Auswertung bzw. Deutung der Kurven teilweise in sehr großzügiger Weise und nicht immer mit der notwendigen Kritik gehandhabt wird. In dieser Tatsache dürfte letzten Endes auch die Ursache dafür zu suchen sein, daß die Thermostromuhrmethode oft der Kritik ausgesetzt ist. Die Fehlermöglichkeiten werden noch größer, wenn mit nicht oder nur wenig geeichten oder ungeeigneten Elementen gearbeitet wird. Wir mußten auch feststellen, daß nicht alle Elemente, die in oft wiederholten Modelleichungen übereinstimmende Exponenten ergeben hatten, sich im in vivo-Versuch als ebenso brauchbar erwiesen. Die Zahl der wirklich geeigneten Elemente ist in Übereinstimmung mit Rein klein; das Herausfinden solcher Elemente ist meist mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden.

Bei Berücksichtigung der von Rein angegebenen Sicherheitskautelen und Beachtung obiger Fehlerquellen dürften bei kritischer Analyse jeder einzelnen Reaktion Fehldeutungen sich auf ein Mindestmaß reduzieren lassen. In ausgedehnten Versuchsreihen mit Adrenalin und Arterenol gelangten wir zu Ergebnissen, die mit den aus der Literatur bekannten und

anderen Methoden gewonnenen Resultaten übereinstimmen. Die Möglichkeit, mit der Thermostromuhr unter relativ physiologischen Verhältnissen an den verschiedensten Stellen des Gefäßsystems gleichzeitig die Durchblutung messen zu können, gibt dabei der von Rein entwickelten Methode einen Vorteil, der von den anderen Verfahren zur Durchströmungsmessung bisher nicht erreicht wurde.

Unsere Beobachtungen und Ergebnisse beziehen sich auf Fehlermöglichkeiten qualitativer Art und quantitativer insoweit, als Relativänderungen der Durchblutung festgestellt werden. Messungen des absoluten Durchflußvolumens schließen sie nicht ein. Auf Grund unserer umfangreichen Modellversuche sind wir der Überzeugung, daß absolute Werte mit der Thermostromuhrmethode kaum zu erhalten sind.

Zusammenfassung.

Es wird auf Grund von annähernd 100 Tierversuchen, bei denen jedesmal die Durchblutungsänderung der Hinterextremitäten nach Injektion von Adrenalin und Arterenol registriert wurde, über eine Reihe von Fehlermöglichkeiten bei der Durchströmungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach Rein berichtet:

1. An Arterien kann es zu qualitativ falschen Durchblutungsanzeigen kommen, wenn auf physiologische oder pharmakologische Reize hin eine Arterienkonstriktion erfolgt.

2. Elemente vom Typ N sind zur Durchströmungsmessung an Arterien nicht brauchbar.

3. Bei Durchblutungssteigerungen kommt es vor, daß die Zunahme der Durchströmung von dem Element sowohl an der Arterie als auch an der Vene in ihrem Ausmaß zu stark wiedergegeben wird.

4. Es wird auf Fehlreaktionen hingewiesen, bei denen die Natur der zugrunde liegenden Störung nicht geklärt werden kann.

5. Im Laufe eines Versuches kann es zu spontanen Änderungen der Durchblutungskurve kommen, die teilweise durch echte Durchblutungsänderungen bedingt sind, teilweise aber die Folge irgendwelcher oft unbekannter Einflüsse auf das Element sind, also Pseudoreaktionen darstellen. Eine Unterscheidung ist meist problematisch.

6. Fehldeutungen treten auf, wenn mit dem Beginn eines Versuches nicht so lange gewartet wird, bis der Ausschlag nach Aufheizen des Blutes seinen vollen Wert erreicht hat.

Die Ergebnisse werden besprochen und auf die Möglichkeit einer Vermeidung von Fehldeutungen hingewiesen.

Literatur.

Cerletti, A., u. E. Rothlin: Über die Thermostromuhrmethode. Helvet. Physiol. Acta **6**, 92 (1948). — Dunker, E., u. W. Köhrmann: Über die Zweckmäßigkeit einer dauernden Kontrolle der Heizenergie bei Messungen mit der Thermostromuhr. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 440 (1953). — Kuschke, H. J., u. E. Westermann: Zur Kenntnis der Kreislaufwirkung des Peripherin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 385 (1953). — Rein, H.: Die Durchblutungsmessungen an Organen in situ, insbesondere mit der Thermostromuhr. Erg. Physiol. **45**, 514 (1944). — Schmidt, W., u. W. Boguth: Zur Eichung Reinscher Thermoelemente. Ärztl. Forschg. **7**, II/65 (1953).

Dozent Dr. J. Dörner, Pharmakologisches Institut der Med. Akademie Gießen, z. Zt. Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 220, S. 503—518 (1953).

Aus den Pharmakologischen Instituten der Universität Würzburg
und der Humboldt-Universität zu Berlin sowie dem Institut für Medizin und Biologie
zu Berlin-Buch.

Über Blutgiftwirkungen des Phenylendiamins und des Toluylendiamins.

Von
K. E. Stahl und F. Jung.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Mai 1953.)

Vor mehreren Jahren hat einer von uns (Jung 1947 [1]) über quantitative Versuche zur Methämoglobinbildung durch Phenylendiamin berichtet, wobei kurz auf die Blutkörperchenveränderungen hingewiesen wurde. Diese sind für Toluylendiamin schon lange bekannt, jedoch war ihr Wesen noch unklar (Stadelmann). Wir haben unsere älteren Versuche inzwischen ergänzt und erweitert, wobei insbesondere zur Diskussion stand, ob diese Zellveränderungen nur in vivo möglich sind. Im Hinblick auf unsere früheren Versuche mit Phenylendiamin stellten wir diesmal Toluylendiamin mehr in den Vordergrund. Die analytische und elektronenoptische Methode war dieselbe wie in früheren Studien (Jung [2]).

A. Tierversuche.

I. Methämoglobinbildung.

a) *Katzen.* Die Versuchstiere erhielten das Toluylendiamin in öliger Lösung intraperitoneal. Das Ergebnis der Versuche ist in der Tabelle abgekürzt wiedergegeben: Im Durchschnitt waren bei einer Dosis von 10 mg/kg (7 Tiere) am Vergiftungsmaximum nach 2—5 Std etwa 44% des Hämoglobins in Methämoglobin umgewandelt; bei einer Dosis von 25 mg/kg (9 Tiere) ergaben sich nach 5—11 Std etwa 47%, bei 75 mg/kg (6 Tiere) nach 8—12 Std etwa 71% und bei 100 mg/kg (2 Tiere) nach 8—9 Std etwa 77%.

Im einzelnen war ferner bemerkenswert:

1. Wiederholte Vergiftung einer Katze (z. B. Nr. 12, 17, 18 und 20) führte zu einer schneller einsetzenden und weiterführenden Methämoglobinbildung. Die Erholung war verzögert.

2. Zwei junge Katzen (Nr. 13 und ein in der Tabelle nicht enthaltenes Tier) reagierten auffallend stark und erholten sich nur langsam.

3. Bei zwei Tieren zeigte sich nach einer vorübergehenden Besserung ein erneuter Anstieg des Methämoglobins (zweiphasiger Verlauf).

Tabelle 1.

Tier Nr.	Dosis mg/kg	Methämoglobin am Maximum %	Methämoglobin Zeitpunkt des Maximums Std	Methämoglobin Ausgangswert nach Tagen	Zellveränderungen Granul. Zellen %	Zellveränderungen Heinz-Körper %	Zellveränderungen Lysierte Zellen mit Granula
Katzen							
8	10	41	3	5	49	—	1
9	10	37	5	4	24	—	—
10	10	39	3,5	8,5	44	—	2—3
11	10	44	3,5	8	19	—	—
12	10	58	2	15,5	33	+	—
13	10	49	3	7	12	—	—
14	10	39	3	6	28	—	—
0/1	25	17	5	3	37	—	—
0/2	25	30	6	4,5	48	3	—
1	25	45	9	18	38	—	2
3	25	52	7	15	27	29	—
4	25	57	6	17	36	38	4
15	25	40	6	12,5	39	5	—
16	25	58	9,5	16	46	—	8
17	25	63	11,5	21	45	7	7
22	25	59	10,5	24	63	—	8
2	50	60	5	18 tot nach	100	—	18
5	75	68	11	21 Std	100	—	15
6	75	68	8	5 Tagen	100	—	70
7	75	68	12	3 Tagen	100	—	67
18	75	73	11	3 Tagen	100	—	68
19	75	72	9	11,5 Std	100	3	33
20	75	74	9	3 Tagen	100	—	69
21	100	76	9	2,5 Tagen	100	—	80
23	100	77	8	1 Tag	100	—	60
Hund				Ausgangswert nach			
H	50	27	6	2,5 Tagen	100	—	20
Kaninchen							
K	75	6	1	5 Std	—	—	—
Meerschweinchen							
M 1	100	7	3	4 Tagen	—	—	—
M 2	200	4,5	3	5 Tagen			—
M 3	500	5	3	1,5 Tagen	—	—	—
M 4	300	5	1,5	—		—	—
M 5	400	4	1,5	—	—	—	—

4. Katze 0/1 bildete auffallend wenig Methämoglobin, während sich die morphologischen Zellveränderungen ebenso wie bei den anderen Tieren entwickelten. Auch ein 3 Monate später durchgeführter Versuch (0/2) an demselben Tiere 0/1 gab auffallend geringe Methämoglobinwerte.

b) *Hund, Kaninchen und Meerschweinchen.* Der Hund scheint wesentlich weniger empfindlich zu sein wie Katzen (nur ein Versuch), während entsprechend früheren Beobachtungen mit Phenylendiamin Meerschweinchen und Kaninchen praktisch nicht reagierten. Doch sind die Tierzahlen insgesamt für eingehendere Auswertungen zu klein.

Aus den Versuchen an den Katzen läßt sich entnehmen, daß die Wirksamkeit des Toluylendiamins (bezogen auf das Maximum der Methämoglobinbildung) der des Phenylendiamins nachsteht. Die Wirkungsdauer ist bei allen Dosen, auch den „wirkungsgleichen Dosen", geringer. Berücksichtigt man die an Katze 0/1 bzw. 0/2 erhaltenen Ergebnisse nicht, so ergibt sich für die Dosis 25 mg/kg ein Wert von 53% umgewandeltes Hämoglobin, womit sich eine einigermaßen stetige Dosis-Wirkungskurve aufzeichnen läßt. Diese ist nicht linear, da die Wirkung langsamer wächst als die Dosis.

Übrigens kann bei dem besonderen Verlauf der Vergiftung die Wirkung nicht mit der am Maximum gebildeten Methämoglobinmenge parallel gesetzt werden, da sich die Vergiftungsdauer mit steigender Dosis verlängert. Vor einer Klärung des Bildungsmechanismus des Methämoglobins und einer Untersuchung der Rückbildungsbedingungen unter der Vergiftung muß von irgend einer Berechnung des Zeitintegrals der Wirkung (Wirkungsmenge) Abstand genommen werden. Ein vor Jahren (1944) dazu angegebenes Verfahren (Jung [3]), bei dem die Fläche unter der Verlaufskurve mit der Rückbildungskonstante multipliziert wurde, setzt einen exponentiellen Verlauf der Methämoglobinrückbildung voraus, ein anderes von Kiese (1947) angegebenes Verfahren dagegen einen Rückbildungsverlauf nach einer Reaktion 0-ter Ordnung. Trotz eingehender Studien läßt sich der Verlauf der Rückbildung noch auf keine konkrete Form zurückführen. Zudem werden bei Vergiftungen mit stark hämolysierenden oder die Zellen auf andere Weise zerstörenden Verbindungen derartige Berechnungen unsicher, da die Basis eines festen Hämoglobinbestandes fehlt.

II. Veränderungen der Blutzellen.

Retikulocyten, Heinzsche Körperchen und schließlich „granulierte Zellen" wurden getrennt ausgezählt. Unter den letzteren wurde nach der Ausbildungsart der Granula differenziert. Grundsätzlich wurden im Ausstrich zu den granulierten Zellen auch die Granula-tragenden hämolysierten Reste zerstörter Zellen gerechnet, da ein Teil der Hämolyse auf die mechanische Läsion der sehr labilen Zellen beim Ausstreichen zurückgeführt werden muß.

Die Resistenzbestimmungen wurden mit Hilfe einer logarithmischen Verdünnungsreihe der üblichen Tyrode-Lösung durchgeführt, da dann normales Blut etwa symmetrische Kurven gibt.

Die Abb. 1 gibt typische Beispiele für den Verlauf der Vergiftung mit den beiden Verbindungen. (Ein weiteres Beispiel dieses Archiv *204*, S. 137.)

a) *Körnchenzellen.* Wenige Stunden nach Verabreichung des Phenylendiamins treten bei den Katzen an einzelnen Zellen allerfeinste Körnchen auf, die zuerst nur elektronenoptisch feststellbar sind. Ihre Zahl und Größe nimmt ständig zu, so daß bei höheren Dosen (ab 20 mg/kg

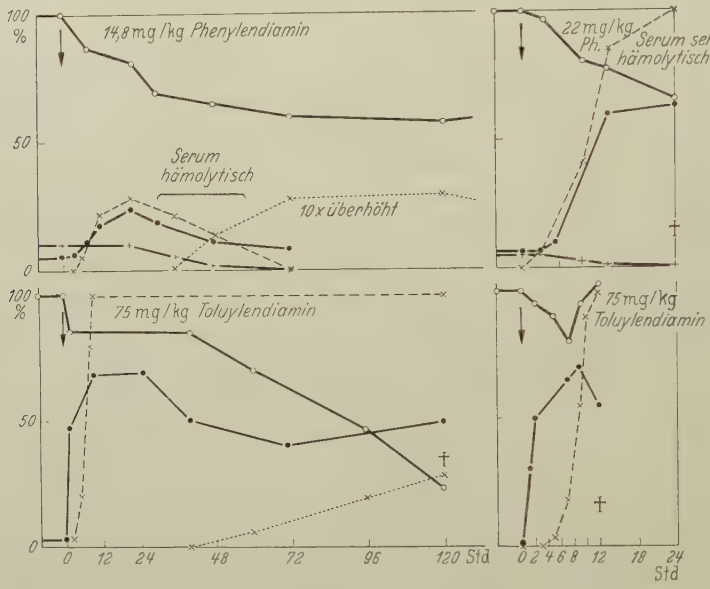


Abb. 1. Vergiftungsablauf an Katzen nach intraperitonealer Gabe von Phenylendiamin (Katze A 2 und A 5) und Toluylendiamin (Katze 6 und 19).

○——○ Hämoglobin (% des Ausgangswertes);
•——• Methämoglobin (% des Gesamthämoglobins);
+——+ Heinzsche Körperchen
×- - -× Körnchenzellen
×·····× Retikulocyten
} je % erkrankte Zellen.

Phenylendiamin intraperitoneal) alle oder fast alle Blutzellen davon befallen erscheinen. Die erkrankten Zellen sind Retikulocyten sehr ähnlich, lassen sich aber durch Vitalfärbung und besser elektronenoptisch abtrennen. Bei Retikulocyten ballen sich die Anhäufungen vital-färbbarer Substanz mehr im Zellinnern zusammen, während sie bei diesen Zellen weiter peripher sitzen. Mit zunehmendem Befall der Zellen finden sich im Nativpräparat auch Körnchen-besetzte lysierte Membranen und schließlich mehr und mehr ziemlich formlose Körnchenkonglomerate. Gleichzeitig entwickelt sich eine Anämie.

Wird das Blut eines vergifteten Tieres hämolysiert, so gewinnt man durch Zentrifugation wesentlich farbstoffreichere Sedimente als bei normalen Tieren. Das Hämolysat erscheint bei schwer vergifteten Tieren meist nicht ganz klar. In den niedergeschlagenen Zellresten ist Methämoglobin, Hämoglobin und vermutlich auch irgendein „Verdoderivat". Die Zell- bzw. Farbstoffreste lassen sich in Harnstoff wie konzentrierter Natronlauge lösen. Die Körnchen bestehen daher wohl aus denaturiertem und weiter verändertem Blutfarbstoff.

Beim Meerschweinchen waren auch nach hohen Phenylendiamindosen veränderte Blutzellen nicht nachweisbar.

Grundsätzlich dieselben Zellveränderungen wie auf Phenylendiamin wurden nach Toluylendiamin beobachtet. Das elektronenoptisch erhaltene Bild deckte sich praktisch. Im einzelnen war der Ablauf auf Toluylendiamin etwa folgender:

Katze 10 mg/kg. Nach 2—3 Tagen hatten sich im Blut etwa 30% der Zellen verändert (sehr feine bis feine Granula). Eine Parallelität zwischen dieser Zellveränderung und der Methämoglobinbildung war nicht vorhanden. Die veränderten Zellen waren noch 2—3 Wochen nach dem Versuch nachweisbar.

Katze 25 mg/kg. Die ersten sehr feinen Granula waren bereits nach einigen Stunden sichtbar. 12—24 Std lang nahm Zahl und Intensität der Granula weiter zu.

Katze 50 mg/kg. Nach 2 Std waren etwa 10%, nach 11 Std 100% der Zellen befallen. Die Granula vergröberten sich im Laufe des Versuches schnell. 15 Std nach Versuchsbeginn waren in Nativpräparaten des Blutes die ersten granulierten Membranen vorhanden. Etwa 20 Std nach Versuchsbeginn wurden im Blut wieder Zellen ohne Granula sichtbar.

Katze 75 mg/kg. 8—11 Std nach Versuchsbeginn waren alle Zellen befallen. Gleichzeitig wurden auch die ersten Membranen nachweisbar. Mitunter wurden am zweiten Tag nach der Vergiftung ungranulierte Zellen im Blut gesehen, des öfteren in späteren Phasen auch Ovalocyten. Da gleichzeitig Zellen mit feinen Granula auftauchten und auch die Ovalocyten granuliert wurden, dürfte der pathologische Prozeß bei dieser Dosis ziemlich lange anhalten.

Katze 100 mg/kg. Während das eine Tier ähnlich wie die Tiere mit 75 mg/kg reagierte, zeigte das andere einen etwas langsameren Anstieg der granulierten Zellen.

Hund 50 mg/kg. Nach 3 Std traten die ersten Körnchen auf, nach 7,5 Std waren 50% befallen, und nach 12 Std wurden die ersten Membranen gesehen.

Bei dem Kaninchen wie den Meerschweinchen konnten keine eindeutigen Zellveränderungen festgestellt werden. Körnchenzellen waren bestimmt nicht nachweisbar, mitunter entstand jedoch der Verdacht irgend einer anderen — nicht recht zu fassenden — Störung (auffallende Schrumpfungsneigung).

Die elektronenoptischen Aufnahmen (Abb. 2) mögen den Verlauf der Entwicklung der Zellveränderungen wiedergeben. Aus ihnen dürfte deutlich werden, daß es sich um einen in den Außenschichten der Zelle lokalisierten zerstörenden Prozeß handelt, welcher schließlich zur Zerstörung der Membran und zum Freiwerden noch undenaturierten Hämoglobins führt. Der grundsätzliche Unterschied zu den unter Dinitroglykol, Dinitrobenzol usw. auftretenden sehr massiven Koagulaten bzw. gar den Hämoglobinausfällungen bei $KClO_3$-Einwirkung ist wohl deutlich (vgl. Jung [4]).

Die Lokalisation der Granula in den Außenschichten läßt sich aus der gleichmäßigen Verteilung über das ganze Präparat hinweg entnehmen. Auch an den Umschlagstellen der Membran wird sie deutlich. (Beachte z. B. die erste Zelle der unteren Reihe.) Vermutlich hängt sie mit der Lokalisation des die Giftwirkung des Phenylendiamins in der Zelle auslösenden Fermentsystems zusammen. Die feineren Granula der Abbildung liegen jenseits des lichtoptischen Auflösungsbereiches. Im einzelnen zeigen die Granula eine ziemlich gleichmäßige Größe und Dichte. Die größeren Konglomerate scheinen durch Zusammenlagerung einzelner Granula entstanden zu sein. Die einzelnen Körnchen sind meist nicht scharf gegen ihre Umgebung abgegrenzt, sondern zerfließen am Rand.

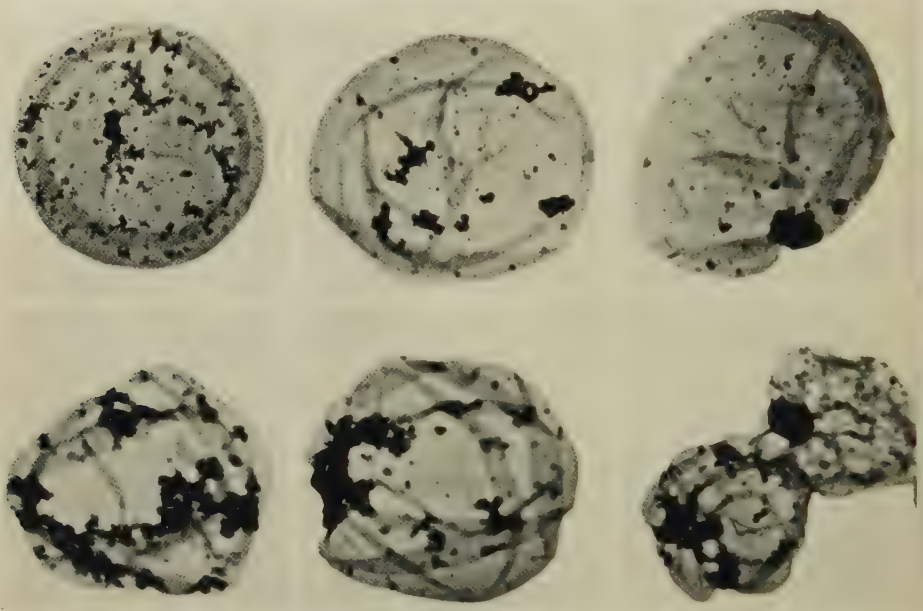


Abb. 2. Blutkörperchenveränderungen nach Toluylendiamin (Versuch von Abb. 1). Obere Reihe etwa 9 Std nach Injektion (468, 466 und 467 je 10000fach — Serie A 49). Untere Reihe etwa 12 Std nach Injektion (458, 455 je 10000fach und 460 8000fach). Als letzte Zelle beider Reihen wurde je eine Heinz-Körperchen tragende Zelle gewählt.

b) Heinzsche *Körperchen*. Bildung Heinzscher Körperchen wurde meist nicht beobachtet, doch besaßen die meisten Katzen solche vor Versuchsbeginn in zählbaren Mengen. Im Verlauf der Vergiftung verschwanden diese völlig (vgl. Abb. 1). Bei direkter Beobachtung ließ sich feststellen, daß die Heinzsche Körperchen tragenden Zellen besonders schnell Körnchen bekamen. Wäre dies nicht der Fall, so könnte man den am 1.—3. Vergiftungstag zu beobachtenden Schwund der Heinzschen Körperchen als direktes Maß des Blutzerfalls betrachten (Markierungseffekt), dies kann aber nicht der Fall sein: Z. B. traten bei einem der abgebildeten Versuche im Maximum 22% Körnchen-tragende Zellen auf,

trotzdem verschwanden von den primär festgestellten 11% Heinzsche Körperchen tragenden Zellen alle und nicht nur 2—3%.

Ausnahmen bildeten Katze 3 und 4, bei welchen während der Vergiftung eine auffallend geringe Menge Körnchenzellen, dafür aber 29 bzw. 38% Heinzsche Körperchen *neu* auftraten. Katze 17 bildete ebenfalls in zahlreichen Zellen typische Heinzsche Körperchen, gleichzeitig zeigten diese Zellen aber auch eine feine Körnelung.

c) *Retikulocyten.* Fast regelmäßig traten am 2.—3. Tag Retikulocyten im peripheren Blut auf, welche als Hinweis auf Regenerationsvorgänge in ungewöhnlichem Ausmaß verwertet wurden. Retikulocyten treten nämlich bei Katzen auch bei stärkerer Anämie kaum im Blut auf.

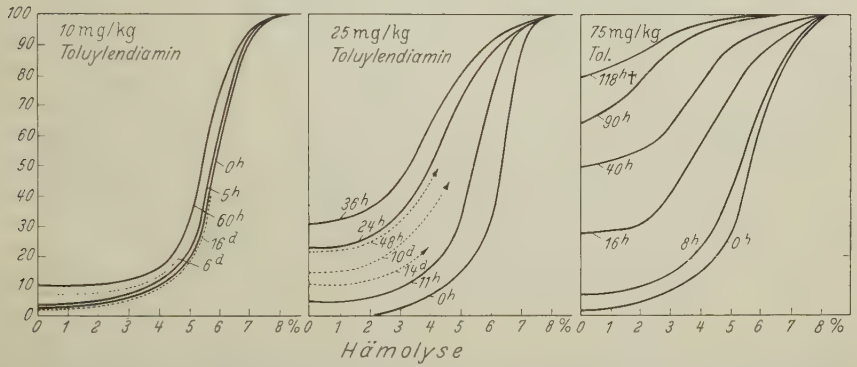


Abb. 3. Osmotische Resistenz des Blutes Toluylendiamin-vergifteter Katzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Vergiftungsbeginn. Ordinate: % Hämolyse. Abszisse: Verdünnungsreihe einer physiologischen Salzlösung: *0* unverdünnt, also isoton; *1* 0,890 isoton; *2* $(0{,}890)^2$ isoton = 0,794 isoton usw. Zeitangaben teils in Tagen, teils in Stunden.

Nach tödlichen Dosen setzte prämortal oft eine erhebliche Retikulocytenausschwemmung ein, die bis zu Werten um 30% im Leichenblut führte. Der Charakter der Granulation und die Polychromasie belegten, daß es sich um echte jugendliche Zellen handelte. Praktisch keine Retikulocyten waren nur bei Katze 5 zu sehen. In einer Reihe weiterer Fälle kamen zu den Retikulocyten auch kernhaltige Zellen hinzu.

Während bei den Meerschweinchen keine pathologischen Zellveränderungen beobachtet wurden, trat fast in allen Fällen eine deutliche Retikulocytenzunahme ein.

d) *Osmotische Resistenz.* Die osmotische Resistenz der Zellen läßt sich eindeutig auf die Art der Zellveränderungen beziehen. Dies ist um so auffallender, als eine entsprechende Beobachtung für die klassischen Heinz-Körperchen nicht gilt. Die Ergebnisse waren für Phenylendiamin und Toluylendiamin weitgehend identisch. Sie werden wegen Verlust der Unterlagen nur für Toluylendiamin behandelt. Abb. 3 (*a*—*c*) gibt drei typische Ergebnisse wieder: Bei der Katze führten Dosen um 10 mg/kg

trotz der recht massiven Methämoglobinbildung zu keiner wesentlichen Resistenzveränderung. Trotzdem die Methämoglobinbildung bei der Dosis von 25 mg/kg nicht wesentlich stärker war, ergab hier die osmotische Resistenz erheblich verminderte Werte. Dementsprechend zeigte auch ein Teil der Tiere 24 Std nach der Vergiftung ein hämolytisches Serum. Nach der Dosis 75 mg/kg war die osmotische Resistenz äußerst stark verringert. Beim Tod der Tiere waren praktisch alle Zellen in physiologischer Salzlösung (Tyrode) lysierbar. Dementsprechend kam es zu einer massiven Hämoglobinurie. Eine massive intravitale Lyse ist für Toluylendiamin schon sehr lange bekannt.

e) *Anämie.* Nach der Dosis 10 mg/kg trat bei der Katze nicht immer eine Abnahme des Hämoglobins und der roten Blutzellen auf. Die Anämie entwickelte sich langsam, nach 5—20 Tagen war sie überwunden und mitunter sogar durch übernormale Werte des Hämoglobins überkompensiert (wohl Folge einer Knochenmarksreizung).

Bei 2 Tieren (13 und 14) trat zu Versuchsbeginn ein Anstieg des Hämoglobins auf, (wohl Depotausschüttung infolge der Gewebsanoxie). Bei einigen Tieren traten statt der Anämie bis zu 40 Std dauernde übernormale Werte auf, dann begann sich eine Anämie zu entwickeln. Dieser Befund könnte im Hinblick auf das bei höheren Dosen beobachtete Lungenödem Ausdruck einer Capillarschädigung sein.

Nach der Dosis 25 mg/kg setzte meist auf eine kurze initiale Zellvermehrung ein definitiver Absturz bis auf Werte von 2,3 $\times 10^6$ Zellen/mm^3 ein. Bei 3 Tieren schaltete sich wiederum ein etwa 100 Std nachweisbarer vermehrter Wert ein, bevor die Anämie deutlich wurde. Bei der Dosis 75 mg/kg entwickelte sich in jedem Fall eine schnell progrediente Anämie. Diese war auch meist die Todesursache, da das Gesamthämoglobin bis auf $^1/_4$ absank und infolgedessen (bei 50% Hb [3]) der Verlust an O_2-transportfähigem Farbstoff $^7/_8$ betrug. Ausnahmen siehe unten (Katze 5 und 19).

f) *Leukocyten.* Während der Vergiftung trat — wohl als Ausdruck der Knochenmarksreaktion — regelmäßig eine Leukocytose ein.

III. Weitere Vergiftungserscheinungen.

Katze. Bei Dosen um 10 mg/kg traten keine besonderen Erscheinungen auf. Nach 25 mg/kg fiel in der ersten Phase der Vergiftung Salivation, Niesen und häufiges Schlucken der Tiere auf. Später waren die Tiere ziemlich apathisch. Einige zeigten Diarhöe und Polyurie. Die Methämoglobinbildung führte zu einer erheblichen Cyanose. Eine bräunliche Verfärbung der Schleimhäute könnte nicht nur auf diese, sondern auch auf einen aus dem Toluylendiamin entstandenen Farbstoff zurückgeführt werden.

Bei den höheren Dosen (75 mg/kg) wurden die Tiere bald kraftlos und somnolent. Die Peripherie war schlecht durchblutet. Eingetretene Blutungen waren infolge schlechter Gerinnung kaum zu stillen. Schließlich

wurden die Tiere hochgradig adynam und starben im Koma. Bei Katze 20 traten Krampferscheinungen auf, die bis zum Exitus anhielten. Bei der Sektion zeigte dieses Tier einen Hydrothorax. Wegen der sonstigen pathologisch-anatomischen Veränderungen sei auf die Literatur verwiesen (speziell auch Stahl).

Beachtenswert war ein abweichender Verlauf der Vergiftung bei 3 Tieren, die primär als besonders gesund und kräftig imponierten: Bei Katze 19 (75 mg/kg) stiegen nach $7\frac{1}{2}$ Std das Hämoglobin und die Erythrocyten des peripheren Blutes wieder an. Gleichzeitig trat eine starke Salivation und Atmungsvertiefung auf. Bei Auskultation waren grobblasige Rasselgeräusche deutlich. Die Dyspnoe nahm weiter zu bis zur 11. Std, dann schien das Tier völlig erschöpft. Es trat noch schaumig-seröse Flüssigkeit aus Nase und Maul aus. Dann kam das Tier zu Tode. Die Sektion ergab ein klassisches Lungenödem, das sich entlang der Trachea bis an die Stimmritze ausdehnte, so daß auch das Lumen der Trachea erheblich eingeengt war (vgl. Abb. 1).

Ähnlich verlief auch die Vergiftung bei Katze 5 (75 mg/kg) und bei Katze 23 (100 mg/kg), doch setzte das Ödem langsamer und erheblich später ein. Da bei Katze 7 nach Eintritt des Atemstillstandes sofort der Thorax geöffnet wurde und dabei ein kräftig schlagendes Herz vorgefunden wurde, kann das Ödem keine kreislaufdynamischen Gründe gehabt haben. Wahrscheinlich bewirkte das Toluylendiamin eine Schädigung der Lungencapillaren.

Hund. Nach Ablauf der akuten Vergiftungserscheinungen trat an den folgenden Tagen ein starker Ikterus auf, die Hämoglobinurie war nicht sehr stark.

Die übrigen Tiere zeigten keine besonderen Erscheinungen.

B. Versuche in vitro.

Methodik: Gewaschene menschliche oder Meerschweinchen-Blutkörperchen wurden in Tyrodelösung aufgeschwemmt. 10 ml der Suspension wurden bei 37° mit verschiedenen Mengen Toluylendiamin versetzt und vor Versuchsbeginn und weiterhin alle 30 min Hämoglobin und Methämoglobin, das Ergebnis der Vitalfärbung und schließlich die osmotische Resistenz der Zellen bestimmt. Wegen der Sedimentation der Zellen müssen die Ansätze immer wieder aufgeschüttelt werden. Die Genauigkeit der Versuche dürfte aus diesem Grunde nicht allzugroß sein.

Das Ergebnis ist in Abb. 4 wiedergegeben. Die Methämoglobinbildung in der Suspension verlief ungefähr proportional der zugesetzten Toluylendiaminmenge. Wurde gleichzeitig die Gesamthämoglobinkonzentration bestimmt, so sank diese im Verlauf des Versuchs merklich ab (nach 7 bis 10 Std auf etwa 70%), gleichzeitig bildete sich ein körniger Niederschlag. Der Verlauf der Methämoglobinbildung war bei beiden Blutarten praktisch identisch. Erhebliche Differenzen zeigte die Ausbildung granulierter Zellen. Während diese bei den menschlichen Blutkörperchen erst einsetzte, nachdem die Methämoglobinbildung abgelaufen war, trat sie bei den Meerschweinchenzellen vor jener auf. Auch der lytische Zerfall der Membranen wurde bei den Meerschweinchenzellen schon nach 3—4 Std deutlich (über 50% der Zellen zerstört), während er bei den menschlichen Zellen erst nach etwa 12 Std dieselben Werte (50%) erreichte. Die Entwicklung der Granula verlief bei beiden Blutarten ähnlich, indem sich zunächst sehr feine Körnchen ausbildeten, die immer zahlreicher und

größer wurden, bis schließlich die Zelle zerstört war. Die Entwicklung der Granula wurde für beide Blutarten auch elektronenoptisch festgehalten. Abb. 5 möge ein Bild des Vorgangs vermitteln. Es ist aus ihr bei Vergleich mit Abb. 2 zu entnehmen, daß die morphologischen Zellveränderungen in vivo und vitro etwa dieselben sind.

Die osmotische Resistenz der Zellen verschob sich nach *demselben* Modus wie bei den Versuchen in vivo; auf eine Gesamtdarstellung wird daher verzichtet.

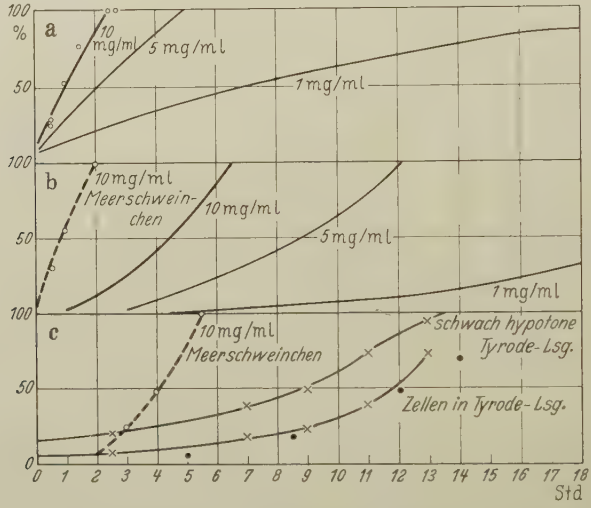


Abb. 4. *a* Bildung von Methämoglobin in Suspensionen menschlicher Blutzellen (Mittelwertskurven). Zellkonzentration um $2 - 3 \times 10^9$/ml. Temperatur 37°, Gasphase: Luft, Suspensionsmedium: physiologische Lösung nach Tyrode. Als Einzelpunkte ist das Ergebnis eines Versuches an Meerschweinchenzellen mit 10 mg/ml Toluylendiamin eingetragen. Der Verlauf deckt sich mit dem entsprechenden Versuch an menschlichen Zellen. *b* Bildung von Körnchenzellen in demselben Versuch. Ausgezogene Kurven: menschliche Blutzellen, gestrichelt: Meerschweinchenzellen. *c* Hämolyse in demselben Versuch. Ausgezogene Kurven: menschliche Blutzellen in Tyrode oder leicht hypotoner Tyrode suspendiert. Einzelpunkte: hämolysierte Zellen im Ausstrich (für Meerschweinchen durch gestrichelte Kurve verbunden). Ordinate in allen Versuchen: je % veränderter Farbstoff, granulierte oder hämolysierte Zellen. Abszisse: Zeit in Stunden.

In Abb. 4 c wird das Ausmaß der unter physiologischen Bedingungen lysierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten wiedergegeben. Aus der Abbildung geht hervor, daß der durch direkte Beobachtung und der colorimetrisch bestimmte Lysegrad bei den Menschenzellen praktisch übereinstimmt. Bei den Meerschweinchenzellen wurde kein Resistenzversuch angesetzt. Die zweite Kurve zeigt den Verlauf des osmotischen Schwellung der Zellen (Bestimmung des Lysegrades in einer hypotonen Lösung, die normale Zellen eben nicht mehr zerstört).

Besprechung.

Eine Reihe unserer Befunde sind Bestätigungen älterer Autoren, denn Toluylendiamin hat wegen seiner hämolytischen Wirkung bereits Schmiedebergs Interesse angeregt, der erstmals damit einen hämolytischen Ikterus künstlich erzeugte. Die

Zusammenhänge dieses Ikterus mit der Zellzerstörung wurden von Affanassiew eingehend studiert.

Aus einem Teil unserer Versuche ist die Tatsache klar zu entnehmen, daß ein wesentlicher Teil des Vergiftungsablaufes seine Ursache außerhalb der Erythrocyten-Schädigung besitzt (Capillarschädigung). Von besonderem Interesse sind für uns die Methämoglobinbildung sowie deren Beziehung zur Zellzerstörung.

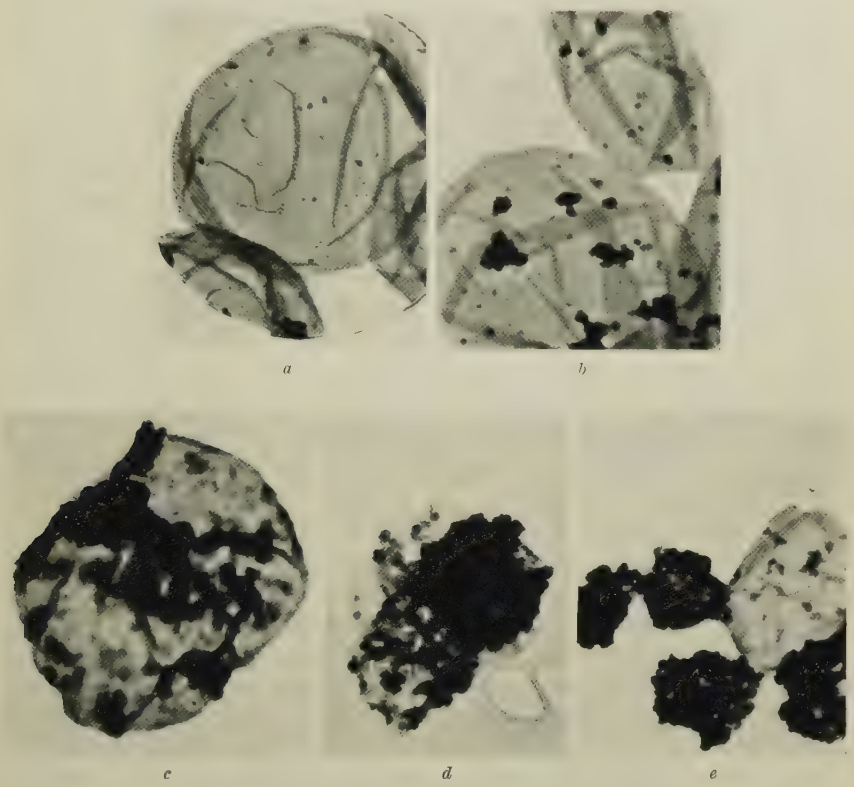


Abb. 5. Erythrocytenveränderungen durch Toluylendiamin (Versuch von Abb. 4). Menschliche Zellen: *a* sofort nach Versuchsbeginn (502); *b* 3 Std (504); *c*, *d*, *e* Zellen weiterhin im Verlauf des Versuchs bis zur völligen Zerstörung. In *e* sind die einzelnen dunklen Gebilde Zellreste nicht ausgestoßene Zellteile (je 10 mg Toluylendiamin/ml).

a) *Methämoglobin.* Eine Deutung der gelegentlich beobachteten Resistenz wie der erhöhten Empfindlichkeit junger Tiere ist hier ebensowenig möglich wie bei anderen aromatischen Stickstoffverbindungen. Auffallend ist die lange Dauer der Methämoglobinbildung. Sie kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: 1. eine lange Haltbarkeit des Amins bzw. seiner wirksamen Umwandlungsprodukte im Organismus und 2. eine Beeinträchtigung der Methämoglobin-rückbildenden Mechanismen. Eine

lange Haltbarkeit des vergiftenden Systems wird durch die Beobachtungen an den roten Blutzellen belegt: Die morphologischen Veränderungen setzen auch noch nach vielen Stunden an den neu ausgeschütteten Blutzellen ein (vgl. oben unter IIa). Sie geht auch aus der Tatsache hervor, daß oft nach einem vorübergehenden Abfall ein neuer Methämoglobinanstieg in den späteren Stadien der Vergiftung beobachtet wird (zweiphasischer Verlauf). Eine Schädigung des rückbildenden Systems war für Dinitrobenzol von Jung und Witt belegt worden. Sie wäre die einfachste Erklärung für einen zweiphasischen Verlauf der Vergiftung, indem ihr ein schnelles Absinken der Rückbildungskapazität bei gleichzeitigem Weiterbestehen der Methämoglobinneubildung zugrunde gelegt würde.

Bei näherer Betrachtung ist nicht nur der langwierige Verlauf der Methämoglobinbildung auffallend, sondern auch die Tatsache, daß sehr lange ein recht gleichmäßiger Blutspiegel gehalten wird. So zeigt einer der in Abb. 1 wiedergegebenen Versuche über etwa 12 Std einen konstanten Methämoglobinwert im Blut. Der Blutspiegel kann als Resultante aus dem vergiftenden Prozeß und den regenerierenden Vorgängen aufgefaßt werden (vgl. hierzu Jung [3], Kiese 1947 und insbesondere Dost). Es ist überraschend, daß sich diese beiden Prozesse über viele Stunden hinweg ohne wesentliche Störung so gut das Gleichgewicht halten sollen. Etwas verständlicher wird dies mit der Feststellung Kieses beim Phenylhydroxylamin, daß die rückbildenden Stoffwechselsysteme auch in den „giftenden" katalytischen Prozeß eingeschaltet sind; aufgeklärt ist es aber damit nicht. Vergleicht man den Ablauf in vivo und vitro — wobei man in vitro etwa auch Metaboliten zusetzen kann —, so fällt auf, daß in vitro der Ablauf der Methämoglobinbildung recht stetig geht. Es bleibt somit nur die recht unbefriedigende Hilfshypothese, daß mit fortschreitender Methämoglobinbildung sich noch andere Stoffwechselsysteme an der Rückbildung beteiligen als die des Blutes. Deren Beteiligung dürfte vielleicht dann merklich werden, wenn irgendwelche Sauerstoffmangelerscheinungen im Gewebe auftreten — also bei etwa 60% Methämoglobin. Dies wäre übrigens eine Parallele zu der Beobachtung, daß bei der Methämoglobinrückbildung im Blut sich auch die Fermentsysteme der gesunden Zellen am Rückbildungsprozeß beteiligen (Jung u. Mitarb. unveröff.). Die Prüfung unserer Annahme ist experimentell zugänglich.

Während der zeitliche Verlauf bei beiden Stoffen etwa derselbe ist, ist die Methämoglobinbildung durch Toluylendiamin deutlich geringer. Dies entspricht früheren Beobachtungen an aromatischen Nitroverbindungen, wonach durch Einführung einer CH_3-Gruppe die Aktivität meist reduziert wird.

b) *Zellzerstörung.* Kurze Zeit nach Vergiftungsbeginn kommt es sowohl in vivo wie in vitro zu feinsten Eiweißausfällungen innerhalb der

Zelle, die mindestens in der Nähe der Membran, wenn nicht in den Außenschichten selbst lokalisiert sind. Diese Eiweißausfällungen sind nicht immer scharf begrenzte Granula, sondern gehen meist irgendwie an einer Stelle verschwimmend in das „Zellstroma" über. Zusammengesetzt sind sie aus denaturiertem Hämoglobin, denaturierten Hämoglobinderivaten und auch Stromaprotein. Ihre Vitalfärbbarkeit erklärt sich am einfachsten aus der Denaturierung, denn denaturiertes Eiweiß mit seinen freien Gruppen vermag Farbstoffe zu binden. Der Nachweis im elektronenoptischen Bild beruht auf der Unlöslichkeit bei osmotischer Hämolyse der Zelle. Vergegenwärtigt man sich die Struktur der roten Blutzelle sowie die Eigenschaften seines Strukturproteins (speziell dessen leichte Denaturierbarkeit) und die Lokalisation der Fermentsysteme der Zelle, so läßt sich der pathologische Prozeß verständlich machen: Im Gegensatz zu den Blutgiften $KClO_3$ und Phenylhydrazin reagiert Phenylendiamin nicht primär mit dem Hämoglobin, sondern muß sich erst mit den Fermentsystemen der Zelle umsetzen. Bei dieser Umsetzung mögen aktive Produkte entstehen, die einerseits Hämoglobin oxydieren können, andererseits Eiweiß denaturieren. Dieser Effekt wird vorzugsweise am Ort der Lokalisation der Fermentsysteme auftreten und dort zu Eiweißausfällungen führen.

Ähnlich dürften auch die Heinzschen Körperchen (durch Anilin, Dinitrobenzol usw.) entstehen. In beiden Fällen sind die Partikelchen peripher lokalisiert. Der andersartige Charakter der Ausfällungen bei Vergiftungen mit $KClO_3$ und speziell Phenylhydrazin äußert sich besonders im andersartigen Verhalten der erkrankten Zellen in den Tagen nach der Vergiftung.

Da sich im Anschluß an die Vergiftung auch Zellreste mit vollständig zerstörter Membran finden lassen, wurde ursprünglich angenommen, daß die Hämolyse Folge einer direkten mechanischen Membranzerstörung sei. In einem bestimmten Moment sollte die Membran ein oder mehrere „Defekte" bekommen, durch welche das Hämoglobin abdiffundiere. (Nichtosmotische Hämolyse nach Wilbrandt.) Nun sind aber derartig vollständig zerstörte Membranen recht selten, bzw. in Vergiftungsstadien mit erheblich reduzierter Resistenz noch nicht nachweisbar. Eine Beteiligung des Gesamtorganismus am lytischen Prozeß wird durch den praktisch identischen Verlauf in vitro ausgeschlossen. Tatsächlich schwellen die Zellen schon vor der Lyse, und der Verlauf der Resistenzkurve zeigt etwa das Verhalten entsprechend der „kolloidosmotischen" Hämolyse Wilbrandts.

Die Ursache hierfür könnte sowohl eine vermehrte Kationenpermeabilität (infolge einer geringfügig denaturierten Membran) wie eine Störung des jonalen Erhaltungsstoffwechsels der Zelle sein. Wir nehmen das letztere an: Die Umsetzung in der Zellperipherie, welche zu den elektronenoptisch und lichtoptisch sichtbaren Eiweißausfällungen führt, dürfte mit einer Schädigung der dort lokalisierten Stoffwechselsysteme verbunden sein. Trifft sie die Zelle so diffus, wie bei den hier behandelten Giften, so verliert die Zelle ihr Vermögen zur Natriumentfernung und

verfällt damit innerhalb einiger Zeit der Hämolyse. Trifft sie dagegen die Zelle nur an einer oder zwei Stellen streng lokalisiert, wie bei der Bildung der Heinzschen Körperchen, so bleibt dieses Stoffwechselsystem im großen ganzen intakt. Die Zelle zeigt daher praktisch eine normale osmotische Resistenz oder nur eine unbedeutende Verringerung derselben. Dies wurde bei der Dinitrobenzolvergiftung der Katze auch beobachtet (Jung unveröff.). Ist die Ausfällung weitgehend auf das Hämoglobin beschränkt wie beim $KClO_3$ oder Phenylhydrazin, so bleibt ebenfalls die Resistenz lange verhältnismäßig gut, um erst nach weitgehender Zerstörung des Zellinnern abzusinken.

Die Zellen werden also bei der Phenylendiamin- und Toluylendiaminvergiftung im wesentlichen durch Hämolyse zerstört; selbstverständlich geht dieser Form der Elimination auch eine Phagocytose in der Milz parallel, die im histologischen Bild nachweisbar ist.

Wir nehmen an, daß sich diese Vorstellungen ohne weiteres auf die früher beschriebene Zellzerstörung durch Arsenwasserstoff übertragen läßt. Damals war als schwer deutbar aufgefallen, daß unabhängig von der Intensität und Dauer der AsH_3-Einwirkung die Hämolyse etwa gleich schnell zustande kam (dieses Archiv *204*, S. 607—608). Es wurde der Schluß gezogen, daß AsH_3 an den Zellen eine ganz bestimmte Veränderung setze. Dies war mit einer denaturierten Membran kaum deutbar, dagegen ist dieser Befund mit der Ansicht vereinbar, daß AsH_3 die Fermentsysteme des jonalen Erhaltungsstoffwechsels der Zelle ausschaltet. Dies führt zu einer in einer bestimmten Zeit ablaufenden Lyse. Hierbei ist beachtenswert, daß das elektronenoptische Bild der AsH_3-behandelten Zellen dem hier beschriebenen recht ähnlich ist.

c) *Zellzerstörung und Methämoglobin.* Aus unseren Versuchen läßt sich zunächst entnehmen, daß die Methämoglobin*bildung* und die Zellzerstörung kein festes Verhältnis zueinander haben. Meist setzte die Zellzerstörung erst nach der Methämoglobinbildung ein. Bei menschlichen Zellen in vitro wurde sie erst merklich, nachdem praktisch alles Hämoglobin oxydiert war. Bei den Meerschweinchenzellen verliefen dagegen beide Prozesse praktisch parallel. Bei der Toluylendiaminvergiftung der Katze entwickelten sich die Körnchen-Zellen etwas später, bei der Phenylendiaminvergiftung gleichzeitig mit dem Methämoglobin. Hämolyse trat immer erst ein, wenn viele Körnchenzellen vorhanden waren. — Beide Vorgänge sind somit nicht aneinander gekoppelt, sondern dürften Folgen eines und desselben Primärprozesses sein: Die Eiweißdenaturierung kann ebenso Folge einer Oxydation sein wie die Methämoglobinbildung. Seit uns bekannt ist, daß unter bestimmten Bedingungen die SH-Gruppen des Globins in einem Redoxgleichgewicht mit dem Hämoglobin-Fe stehen, lassen sich sogar sehr enge Beziehungen denken (vgl. Lemberg-Legge und Jung [6]). Je nach den Eigenschaften der speziellen Proteine bei den einzelnen Tierarten dürfte somit mehr der eine oder mehr der andere Prozeß im Vordergrund stehen.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen beiden Vorgängen ist durch die Kopplung von Methämoglobin-rückbildenden und Ionen-transportierenden Fermentsystemen gegeben.

Matthies hat gezeigt, daß unter bestimmten Bedingungen anwesendes Methämoglobin die Jonentransportprozesse verändert und damit eine schnellere Hämolyse herbeiführen kann. Liegt somit bereits eine primäre Schädigung dieser Systeme vor, so wird allein die Methämoglobin-Bildung Hämolyse auslösen können. Ohne Zweifel dürften solche Vorgänge den Zerfall der Zellen fördern (vgl. hierzu auch Moser).

Schließlich wäre zu berücksichtigen, daß die Beteiligung des Proteins bei der Methämoglobin-Bildung bzw. vor allem der Rückbildung nicht ohne Rückwirkung auf seine Stabilität bleibt. Sich in dieser Weise laufend umsetzendes Hämoglobin denaturiert langsam. Auch dieser Vorgang könnte die Entstehung der Granula spez. ihre Beschwerung mit Hämoglobin bzw. Derivaten desselben fördern.

Angesichts dieser Feststellungen werden einige unserer älteren Vorstellungen revisionsbedürftig: Ohne Zweifel besitzen frisch mit $NaNO_2$ behandelte Erythrocyten oder die Zellen eines frisch vergifteten Tieres (Anilin, Dinitrobenzol, Phenylen- und Toluylendiamin wie in Abb. 3a) trotz eines erheblichen Methämoglobingehalts eine normale oder fast normale Resistenz. Werden aber Blutzellen längere Zeit in diesem Zustand gehalten, so muß die Resistenz aus dem zuletzt genannten Grund abnehmen. Ohne Zweifel bestehen ferner zwischen Methämoglobin und Heinzschen Körperchen, bzw. den Körnchenzellen und ähnlichen Veränderungen, keine direkten Beziehungen. Abgesehen von der gemeinsamen Ursache wird aber eine lang dauernde Methämoglobinämie die Denaturierungsneigung des Hämoglobins erheblich fördern — einmal denaturiert Methämoglobin allein schon leichter als Hämoglobin und andererseits enthalten die Rückbildungsprozesse ebenfalls eine Belastung des Globins. Bei einer lang dauernden Methämoglobinämie wird daher eine Heinz-Körperbildung *immer* zu erwarten sein, auch dann, wenn der Methämoglobinbildner (etwa Nitrit) an sich dieses Vermögen nicht besitzt.

Gerade zu dieser Frage existiert eine Kontroverse zwischen W. Heubner und S. Moeschlin. Heinz-Körperchen dürften eben die Form sein, in der im allgemeinen die Ausfällung des denaturierten Proteins im Zellinnern stattfindet (entweder spontan oder – wie V. Schilling annimmt – an einem in der Struktur präformierten Element).

d) *Sonstige Feststellungen. — Lungenödem.* Die Vermutung liegt nahe, daß es verwandte Prozesse sind, die hier den Ionenaustausch an der roten Blutzelle stören und dort Permeationsveränderungen an anderen Stellen im Organismus bewirken. Die Ursache für das Lungenödem bzw. die bei den Phenylendiaminen überhaupt beobachtete Ödemerzeugung wäre somit faßbar.

Verhalten des Meerschweinchens. Meerschweinchen zeigten sich ebenso wie gegen Dinitrobenzol (Kunz) auch in diesen Versuchen auffallend refraktär. Es wurden weder eine Methämoglobinbildung erheblichen Umfangs noch Zellzerstörungen festgestellt. Überraschend war das Ergebnis in vitro, wo Meerschweinchenblut in bezug auf die Methämoglobinbildung ebenso schnell wie menschliches Blut, in bezug auf die Zellzerstörung erheblich schneller reagierte. Man könnte nun annehmen, daß die Vergiftung deswegen an diesem Tier so symptomlos verläuft, weil die erkrankten

Zellen außerordentlich schnell reagieren und somit ebenso schnell wieder aus dem Kreislauf verschwinden. Immerhin müßte dann eine deutliche Anämie auftreten, was nicht der Fall ist; dieses Problem bleibt somit noch ungeklärt.

Zusammenfassung.

1. Der Verlauf der Blutveränderungen bei Katzen, Hund, Meerschweinchen und Kaninchen nach Gabe von Phenylendiamin und Toluylendiamin wird beschrieben.

2. Die in vivo beobachtbaren Blutkörperchenveränderungen treten in praktisch derselben Weise nach Einwirken der beiden Amine auf die Zellen in vitro auf. Völlig entsprechend verhalten sich die osmotische Resistenz und die morphologischen Veränderungen, während die Methämoglobinbildung in vivo durch regulatorische Vorgänge verzögert wird. Der pathologische Prozeß kann aber in vitro reproduziert werden.

3. Zwischen Methämoglobinbildung und Rückbildung, morphologischen Zellveränderungen und der Hämolyse bestehen kausale Zusammenhänge, an denen die Fermentsysteme der roten Blutzelle wesentlich beteiligt sind.

Literatur.

Affanassiew, M.: Pflügers Arch. **30** (1883). — Dost, F. H.: Der Blutspiegel. Leipzig: Georg Thieme 1953. — Jung, F.: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 133 (1947); (2) **204**, 139, 604 (1947). — (3) Habilitationsschrift Berlin 1944. — (4) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 604 (1947). — Jung, F., u. Witt: (5) Verh. dtsch. Ges. inn. Med. Karlsruhe 1948. — Jung, F.: (6) Dtsch. Gesdwes. **7**, 1313 (1952). — Kiese, M.: Klin. Wschr. **1947 I**, 453. — Kiese, M., u. a.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 393 (1950). — Kunz, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 508 (1942). — Lemberg-Legge: Hematin compounds 1949. — Matthies, H.: Inauguraldiss. Humboldt-Univ. Berlin 1953. — Moser, P.: Verh. der Soc. Internat. Hematol. Montreux 1949. — Stadelmann, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **23**, 427 (1887). — Stahl, E.: Inauguraldiss. Würzburg 1950.

Professor Dr. F. Jung, Humboldt-Universität, Pharmakolog. Institut, Berlin NW 7, Clara-Zetkin-Str. 94.